

Untersuchungen zur Flavonol- und Proanthocyanidinsynthese als Konkurrenzreaktionen in der Flavonoidbiosynthese



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anja Preuß

aus Neubrandenburg

Marburg an der Lahn,

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps Universität Marburg als Dissertation angenommen
am 3. August 2009

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Ulrich Matern

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Maike Petersen

Tag der mündlichen Prüfung: 20. August 2009

Veröffentlichungen, Vorträge und Präsentationen

Wesentliche Auszüge dieser Arbeit wurden in den folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen

1. João R.M. Almeida, Eleonora D'Amico, Anja Preuss, Fabrizio Carbone, C.H. Ric de Vos, Bettina Deiml, Fabienne Mourgues, Gaetano Perrotta, Thilo Fischer, Arnaud G. Bovy, Stefan Martens, Carlo Rosati (2007). Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). Arch. Biochem. Biophys. 465, 61-71.
2. Fabrizio Carbone, Anja Preuss, Ric C. H. De Vos, Eleonora Dàmico, Gaetano Perrotta, Arnaud G. Bovy, Stefan Martens, Carlo Rosati (2009). Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. Plant, Cell & Environmental 32, 1117-1131.
3. Anja Preuß, Ralf Stracke, Bernd Weisshaar, Alexander Hillebrecht, Ulrich Matern, Stefan Martens (2009). *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional flavonol synthase. FEBS Letters 583 (12), 1981-1986.

Vorträge

1. Preuß, A., Matern U. und Martens S.
Flavonol synthesis and expression of genes encoding flavonol synthase and anthocyanidin synthase in *Arabidopsis thaliana*.
Groupe Polyphenol, 24. International Conference on Polyphenols, Salamanca, Spanien, 2008.

Präsentationen

1. Preuß, A., Sagasser M., Stracke R., Weishaar B., Matern U. und Martens S.
Functional expression and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* flavonol synthases.
Groupe Polyphénols, 23. International Conference on Polyphenols, Winnipeg, Kanada, 2006.
2. Preuß, A., Sagasser M., Stracke R., Weishaar B., Matern U. und Martens S.
Biochemical characterization of flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana*.
Deutsche Botanische Gesellschaft, Botanikertagung Hamburg, 2007.

Diese Arbeit wurde am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. U. Matern

im Zeitraum vom 01. März 2005 bis zum 31. August 2008 durchgeführt.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Matern für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und für die wertvollen Diskussionen und Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Martens für die Überlassung dieses vielseitigen Forschungsthemas und insbesondere für die zahlreichen und hilfreichen Diskussionen sowie für die Unterstützung.

Prof. Dr. Maike Petersen danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Herrn Dr. Ralf Stracke (Universität Bielefeld) danke ich für die Bereitstellung der FLS- und ANS-Klone und des Pflanzenmaterials aus *Arabidopsis thaliana*.

Herrn Dr. Carlo Rosati (ENEA, Italien) danke ich für die Klonierung der Flavonoidgene FHT, FLS, DFR, ANS, LAR, ANR, FGT, aus *Fragaria x ananassa*, sowie die Bereitstellung der Erdbeerfrüchte der verschiedenen *Fragaria x ananassa* Sorten.

Des Weiteren danke ich Dr. Alexander Hildebrecht (AG Prof. Klebe, Marburg) für die Erstellung der Homologiemodelle und die hilfreichen Tipps bei der Interpretation der Modelle.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mit-Doktoranden des Institutes für die freundliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Besonders danke ich Simone Witte und Stefanie Hücherig für die angeregten Diskussionen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie, besonders meinen Eltern und bei meinem Freund Simon für die unermessliche Geduld und Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.2	<i>Fragaria x ananassa</i>	3
1.2.1	Pharmazeutische Anwendungen von <i>Fragaria x ananassa</i>	6
2	Flavonoide	7
2.1	Flavonoidmuster in <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
2.2	Flavonoidmuster in <i>Fragaria x ananassa</i>	10
2.3	Pharmazeutisch bedeutende Eigenschaften von Flavonolen und Proanthocyanidinen	11
2.3.1	Antioxidative Eigenschaften	11
2.3.2	Antikarzinogene Eigenschaften	13
2.3.3	Immunmodulierende Eigenschaften	14
2.3.4	Antibakterielle und antivirale Eigenschaften	15
2.4	Bedeutungen von Flavonolen und Proanthocyanidinen für die Pflanze	16
2.5	Flavonoidbiosynthese	18
2.5.1	Biosynthese von Flavonolen	21
2.5.2	Reaktionsmechanismus von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODD's)	24
2.5.3	Biosynthese von Proanthocyanidinen (PA's)	27
2.5.4	Reaktionsweg zu den Flavan 3-olen und Proanthocyanidine	33
3	Aufgabenstellung	37
4	Material und Methoden	38
4.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	38
4.1.1	Radiochemikalien	40
4.1.2	Reagenzienansätze (Kits)	40
4.1.3	Enzyme	40
4.1.4	Antiseren und Proteine	41
4.1.5	Membranen	41
4.1.6	Dünnschichtplatten und Laufmittel	41
4.2	Pflanzenmaterial	42
4.3	Bakterien- und Hefestämme	42
4.4	Vektoren	43

4.4.1	Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten (full length Klone)	43
4.4.2	Vektoren für die Expression in <i>E. coli</i>	43
4.4.3	Vektoren für die Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
4.5	Puffer und Lösungen	43
4.5.1	Lösungen für die Hefetransformation	43
4.5.2	Lösungen für die Bakterientransformation	44
4.5.3	Lösungen für die Isolierung von Plasmid DNA	44
4.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
4.5.5	Western-Blot	45
4.5.6	Puffer für die Säulenchromatographie	46
4.6	Sonstige Puffer	47
4.7	Medien	48
4.7.1	Bakterienmedien	48
4.7.2	Hefemedien	48
4.8	Geräte	49
4.9	Nachweis von Flavonoiden im Pflanzengewebe	50
4.9.1	Extraktion von Flavonoiden	50
4.9.2	Hydrolyse von Flavonoiden	50
4.10	Enzymologische Untersuchungen	51
4.10.1	Synthese von ¹⁴ C-markierten Naringenin und Eriodictyol	51
4.10.2	Synthese von ¹⁴ C-markierten Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin	51
4.10.3	Synthese von Leucopelargonidin und Leucocyanidin	52
4.10.4	Proteinaufarbeitungsmethoden	52
4.10.5	Standardenzymtests	58
4.10.6	HPLC-Analyse	58
4.11	Proteinbiochemische Methoden	59
4.11.1	Bestimmung des Proteingehaltes	59
4.11.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
4.11.3	Westernblot	60
4.12	Molekularbiologische Untersuchungen	61
4.12.1	Standard-PCR	61
4.12.2	Synthese von Oligonucleotiden (Primern)	62
4.12.3	Enzymkatalysierte Reaktionen	62
4.12.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	63

4.12.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	64
4.12.6	Sequenzierung	65
4.12.7	Expression der At_FLS1, 2, 3, 5 und At_ANS in <i>E. coli</i> BL21-A1-Zellen	65
4.12.8	Expression der At_ANS in <i>E. coli</i> K12 TB1-Zellen	66
4.12.9	Transformation kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	66
4.12.10	Expression von At_FLS1, 2, 3, 5, und At_ANS in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
4.13	Reinigung der heterolog exprimierten At_FLS1, 2, 3, 5 und At_ANS aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
4.13.1	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	68
4.13.2	Größenaufschlusschromatographie (SEC)	68
4.13.3	Anionenaustauschchromatographie (DEAE)	69
4.13.4	Reinigung über His-Tag Säule (Immobilized metal affinity chromatographie, IMAC)	70
4.13.5	Reinigung mit Amylose Resin (pMal™ Protein Fusion and Purification System)	71
5	Ergebnisse und Diskussion	73
5.1	Voruntersuchungen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
5.1.1	Pflanzenmaterial	73
5.1.2	Nachweis der Flavonole in <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Extraktion	73
5.1.3	Nachweis der FLS- bzw. ANS-Aktivität in Rohextrakten von Keimlingen und adulten <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	77
5.1.4	Mögliche Wege zu Flavonolen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
5.2	Klonierung der FLS und ANS aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
5.2.1	Expression der At_FLS1, der putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3, 5 und der At_ANS in Hefen	79
5.2.2	Nachweis der FLS- bzw. ANS-Aktivität in Hefetransformanten	79
5.2.3	Expression der At_FLS1, der putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3, 5 und der At_ANS in Bakterien	83
5.3	Reinigung der At_FLS1 und der putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3, 5	84
5.3.1	Größenaufschlusschromatographie (SEC)	84
5.3.2	Anionenaustauschchromatographie (DEAE)	86

5.3.3	Westernblot-Analyse mit der At_FLS1 und den putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3 und 5	88
5.4	Reinigung der At_ANS	89
5.4.1	Reinigung der At_ANS über eine Ni-Affinitätssäule (IMAC)	89
5.4.2	Reinigung der At_ANS über eine Amylose-Affinitätssäule	93
5.5	Sequenzanalyse	96
5.6	Homologiemodelle von At_FLS1, At_FLS3 und At_ANS	98
5.6.1	Kristallstruktur der At_ANS	98
5.6.2	Charakterisierung des aktiven Zentrums von At_FLS1 und At_FLS3	101
5.7	Biotransformation durch Bakterien mit At_FLS3	104
5.8	Herkunft von Flavonolen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	107
5.9	Flavonoide in <i>Fragaria x ananassa</i>	108
5.10	Expression von Enzymen der Flavonoidbiosynthese aus <i>Fragaria x ananassa</i> in Hefen und Bakterien	109
5.11	Nachweis der Enzymaktivitäten in Früchten von <i>Fragaria x ananassa</i>	117
5.11.1	Aktivitätsprofile von Enzymen der Flavonoidbiosynthese in <i>Fragaria x ananassa</i>	121
7	Zusammenfassung	132
8	Anhang	135
8.1	End-to-End-Primer	135
9	Literatur	136

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
Acc. No.	Zugangsnummer (accession number)
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
CAW	Chloroform/Essigsäure/Wasser
Cy	Cyanidin
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
dest.	destilliert
DHK	Dihydrokämpferol
DHM	Dihydromyricetin
DHQ	Dihydroquercetin
DHR	Dihydrorobonetin
DHT	Dihydrotamarexitin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dATP	2`-Desoxyadenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxycytidin-5`-triphosphat
dGTP	2`-Desoxyguanosin-5`-triphosphat
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
dTTP	2`-Desoxythymidin-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERI	Eriodictyol
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
°C	Grad Celsius
g	Gramm

GTE	Glucose/Tris/EDTA-Puffer
h	Stunde(n)
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kat	Katal
kb	Kilobase(npaare)
kDa	Kilodalton
Km	Kämpferol
l	Liter
LB	Luria Bertani Medium
M	molar
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
min	Minute(n)
mM	millimolar
n. a.	nicht anwendbar
NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NAR	Naringenin
nm	Nanometer
nmol	nanomol
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Kaliumacetatlösung
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PVDF	Polyvinylidfluorid
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
Qu	Quercetin
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecylsulfate)
sec	Sekunde(n)

SEC	Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography)
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N'-N'-Tetramethylethyldiamin
Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactopyranosid

Aminosäuren

Alanin	A	Ala	Lysin	K	Lys
Arginin	R	Arg	Methionin	M	Met
Asparagin	N	Asn	Phenylalanin	F	Phe
Asparaginsäure	D	Asp	Prolin	P	Pro
Cystein	C	Cys	Serin	S	Ser
Glutamin	Q	Gln	Threonin	T	Thr
Glutaminsäure	E	Glu	Tryptophan	W	Trp
Histidin	H	His	Tyrosin	Y	Tyr
Isoleucin	I	Ile	Valin	V	Val
Leucin	L	Leu			

Enzyme

ANR	Anthocyanidinreduktase
ANS	Anthocyanidinsynthase
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
Cyt P450	Cytochrom-P450-Monooxygenasen
DFR	Dihydroflavonolreduktase
F6H	Flavonol-6-hydroxylase
F3'H	Flavonoid-3'-hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid-3',5'-hydroxylase
FGT	Flavonoid 3-O-glucosyltransferase
FHT	Flavanon-3- β -hydroxylase (Flavanonhydroxyltransferase)
FLS	Flavonolsynthase
FNS I	Flavonsynthase
LAR	Leucoanthocyanidreduktase
2-ODD	2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase
PAL	Phenylalanin-Ammoniak Lyase

1 Einleitung

1.1 *Arabidopsis thaliana* L.

Arabidopsis thaliana L. (Acker-Schmalwand) (**Abb. 1**) gehört zu der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae) und kommt in den gemäßigten Klimazonen auf der ganzen Welt vor. *A. thaliana* ist ein Wildkraut und wächst auf sandigen und nährstoffarmen Böden in schwachwüchsigen Pflanzengesellschaften. Die Blätter von *A. thaliana* sind wechselständig, ungeteilt und grundständig. Der Blütenstand ist eine offene Traube und die vier weißen Blütenkronblätter sind kreuzständig angeordnet und nicht miteinander verwachsen. Die vier Kelchblätter stehen kreuzweise zu den Blütenkronblättern. Typisch für die Kreuzblütler sind die vier langen und zwei kurzen Staubblätter. Sie lassen sich dadurch von anderen Pflanzenfamilien mit vierzähligen Blüten, wie zum Beispiel den Mohn- und Rötegewächsen, unterscheiden. Die Früchte von *A. thaliana* sind Schoten, d. h. sie sind 3 mal so lang wie breit und entwickeln sich aus zwei miteinander verwachsenen Fruchtblättern. In der Mitte bildet sich eine dünne Scheidewand, an der sich die Samen entwickeln.



Abb. 1: Illustration von *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) (Stephen H. Howell, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, New York).

A. thaliana wurde im 16. Jahrhundert zum ersten Mal von Johannes Thal im Harz entdeckt und als „*Pilosella siliquosa*“ bezeichnet. In der pharmazeutischen Industrie und in der Landwirtschaft hat *A. thaliana* keine Bedeutung. Friedrich Laibach hatte 1943 die Möglichkeit in Erwägung gezogen, *A. thaliana* als Modellorganismus einzusetzen und seitdem ist die Pflanze in der Genetik etabliert.

A. thaliana ist heutzutage ein wichtiges Modellsystem für die Identifizierung von Genen und zur Bestimmung von deren Funktion. Im Jahre 2000 wurde das vollständig sequenzierte Genom dieser Pflanze, das 125 Megabasen umfasst, erstmals veröffentlicht. Von den 125 Megabasen werden 115.4 Megabasen kodiert. Während der Evolutionsgeschichte von *A. thaliana* kam es demnach zu verschiedenen Genomverdopplungen, gefolgt von späteren Verlusten von einzelnen Genen und weiteren Genverdopplungen (The Arabidopsis Genome Initiative et al., 2000). Das Genom enthält 25 498 Gene, die 11 000 Proteine kodieren.

Vorteil von *A. thaliana* für die Genomanalyse ist vor allem das relativ kleine Genom (125 Megabasen), der sehr kurze Generationszyklus (6 Wochen) und die kleine Wuchsform, die die Kultivierung von vielen Pflanzen auf kleinem Raum ermöglicht. Weiter von Vorteil ist die hohe Vermehrungsrate und die Möglichkeit, genetische Manipulationen wie zum Beispiel die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* durchzuführen. Zusätzlich sind viele Mutanten von *A. thaliana* bekannt. Zum Beispiel werden bei der *ttg1*-Mutante (*transparent testa glabra 1*) keine Trichome mehr gebildet, was zur Verminderung der Wurzelhaarbildung führt. Außerdem sind die Samen gelb anstatt braun, was darauf zurückzuführen ist, dass die kondensierten Proanthocyanidine (PA's) in den inneren Integumenten der Samenschale fehlen (Broun et al., 2005). Die Überexpression des RED Gens aus Mais (*Zea mays* L., Poaceae) ermöglicht in *ttg1*-Mutanten die Korrektur dieser Defekte, d.h. dieses Gen kann die Trichom-, Wurzelhaarbildung, Samenschalenentwicklung und Flavonoidproduktion wiederherstellen. RED kodiert einen basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktor und reguliert unter anderem die Anthocyanidinbiosynthese in Mais. In *A. thaliana* wird die Anthocyanidinbiosynthese von einem Regulationsfaktor aus derselben Klasse wie das RED Gen kontrolliert.

1.2 *Fragaria x ananassa* L.

Die Gattung *Fragaria* (Erdbeere) gehört zu der Familie der Rosengewächse (Rosaceae, Unterfamilie Rosoideae). Sie wächst als Staude mit holzigen, fadenförmigen Ausläufer treibendem Wurzelstock. Die Blätter sind grundständig, gefingert, langgestielt und dreizählig. Die Unterseite der Blätter ist seidenhaarig und die Oberseite nur locker anliegend behaart. Die fünfzählige Blüte ist stets radiär angeordnet und weiß. Der oberständige Fruchtknoten ist aus zahlreichen Fruchtblättern aufgebaut und aus jedem einzelnen Fruchtblatt entwickelt sich eine Nussfrucht. Die Erdbeere ist aus botanischer Sicht keine Beere, sondern eine Sammelnussfrucht. Das rote Fruchtfleisch bildet eine Scheinfrucht (Sammelfrucht) und die darauf sitzenden gelben Nüsschen sind die eigentlichen Früchte.

Schon in der Antike waren die Erdbeeren bekannt und wurden „frega“ oder „fregum“ genannt. Im Mittelalter wurden große Flächen mit Wald-Erdbeeren (*Fragaria vesca*) kultiviert und erst im 18. Jahrhundert kamen großfrüchtigere Wildsorten nach Europa. Der botanische Name „*Fragaria*“ leitet sich vom lateinischen Namen „*fragare*“ = duften ab. Die uns heute bekannte Garten-Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) (**Abb. 2**) ist eine Kreuzung aus verschiedenen Wildformen und entstand 1750 in Holland durch zufällige Kreuzungen der Scharlach-Erdbeere (*F. virginia*) mit der Chile-Erdbeere (*F. chiloensis*) (Lerceteau-Köhler et al., 2003). Diese neue Mischform wurde von den Holländern wegen ihres Geschmacks und der Form als „Ananas-Erdbeere“ bezeichnet und wird als Stammform unserer heutigen Garten-Erdbeere gesehen. Derzeit gibt es 12 Arten von der *Fragaria*, davon kommen 11 Arten in den gemäßigten Zonen der Nordhalbkugel und eine Art in Chile (*F. chiloensis*) vor. Mittlerweile sind über 1000 verschiedene Sorten bekannt, die sich in Aroma, Geschmack, Konsistenz, Farbe, Größe und im Säuregrad unterscheiden (Carbone et al., 2006).



Abb. 2: *Fragaria x ananassa* (Garten-Erdbeere) (Elizabeth Cameron, Allangrange Prints)

Tab. 1: Sorten von *Fragaria x ananassa*

Sorten	Merkmale der Früchte
Darselect	große, wohlschmeckende Früchte
Elsanta	große, feste Früchte
Florence	späte Sorte, großfruchtig und im Geschmack mäßig
Honeoye	kräftig rote Früchte
Korona	große, wohlschmeckende Früchte
Polka	mittlere Fruchtgröße und im Geschmack sehr gut
Symphony	groß- bis mittelfruchtig, mittelrot und im Geschmack aromatisch
Thuriga	große, leuchtend rote Früchte und im Geschmack gut
Senga Sengana	mittelgroße, dunkelrote Früchte
Mieze Schindler	kleine, dunkelrote Früchte und im Geschmack aromatisch
Tenira	große, intensivrote Früchte
Elvira	große, sattrote Früchte

Die Sorten ‘Senga Sengana’, ‘Mieze Schindler’, ‘Tenira’ und ‘Elvira’ hatten in der Vergangenheit einen hohen Bekanntheitsgrad, werden heutzutage aber nur noch in Hausgärten angebaut, da sie von neueren Sorten verdrängt wurden.

Der Gehalt an Inhaltsstoffen der einzelnen Erdbeeren kann sich innerhalb einer Pflanze derselben Sorte, von Pflanze zu Pflanze und in Abhängigkeit vom Standort deutlich unterscheiden. Der Grund für diese starke Variabilität im Gehalt der jeweiligen Inhaltsstoffe beruht auf der kurzen Blüte- und Erntezeit, sowie auf dem direkten Einfluss von Witterung und Klimabedingungen, wie Lichtintensität, Temperatur und Feuchtigkeit. Das wiederum hat Einfluß auf das Wachstum, die Inhaltsstoffe und auf die Erntezeit. Die Erdbeer-Frucht bietet viele verschiedene Inhaltsstoffe, ist reich an Vitaminen, wie zum Beispiel Provitamin A (Carotin), B1 (Thiamin), B2 (Riboflavin), C (Ascorbinsäure), E (Tocopherol) und Folsäure. Der Gehalt an Vitamin C in den Früchten übersteigt mit 60 mg pro 100 g Fruchtfleisch sogar den der Orangen und Zitronen (Pinto et al., 2008). Damit konnten auch die gefundenen antioxidativen Eigenschaften der Erdbeere erklärt werden. Als eine weitere pharmazeutisch wichtige Verbindungsklasse sind die phenolische Säuren zu nennen. Erdbeer-Früchte enthalten Salicylsäure, Zimtsäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure, Ferulasäure und Ellagsäure. Die Phenolsäuren haben im Allgemeinen viele gesundheitliche Eigenschaften. So beugen sie Infektionen und Herz-Kreislaufkrankungen vor, und die Ferulasäure und Ellagsäure weisen außerdem einen schützenden Effekt gegen Krebserkrankungen auf (Seeream et al., 2006). Weiterhin kommen mit 11% Gehalt oligomere PA's (kondensierte Gerbstoffe) in Erdbeeren vor, die, wie Vitamin C, zu den Antioxidantien zählen (Pinto et al., 2008). Die Scheinfrüchte sind auch gute Lieferanten von Mineralstoffen, die sich in den Nüsschen auf dem Fruchtfleisch befinden. Sie enthalten reichlich Mangan und Eisen, aber auch viel Calcium und Magnesium. Daneben kommen noch Phosphor, Kupfer und Kalium in größeren Mengen vor. Eine weitere interessante Inhaltsstoffgruppe sind die Flavonoide. Diese werden im **Kapitel 2** näher besprochen. Außerdem enthalten Erdbeeren noch ätherisches Öl und Fruchtsäuren.

1.2.2 Pharmazeutische Anwendungen von *Fragaria x ananassa*

Für die pharmazeutische Anwendung werden die während der Blütezeit gesammelten Laubblätter (Folium Fragariae) von *F. vesca* verwendet. Hier sind vermutlich, wie bei anderen Rosaceen, milde Gerbstoffe von Bedeutung. In der Volksmedizin werden die Blätter zur Behandlung von Durchfall und zur Linderung von Gicht und Rheuma angewendet. Außerdem finden die Blätter als Gurgelmittel und zur Mundhygiene Anwendung. Die jungen Blätter der Erdbeere können auch als Ersatz für schwarzen Tee verwendet werden. In der Homöopathie werden die frischen Früchte als Ausgangsmaterial für das Homöopathikum „Fragaria“ benutzt und zur Behandlung von Nesselausschlägen, Verdauungsschwäche und Durchblutungsstörungen verwendet. Außerdem werden den Erdbeeren weitere Wirkungen nachgesagt: sie entgiften den Darm, stärken den Stoffwechsel und das Immunsystem, sie wirken harntreibend, d. h. die Nierentätigkeit wird angeregt, wobei diese Wirkung vermutlich auf das Vorkommen von Flavonoiden zurückzuführen ist. Erdbeeren fördern desweiteren aufgrund ihrer Inhaltsstoffe das Zellwachstum, wirken blutsenkend und blutbildend.

Bei empfindlichen Menschen kann es durch die Aufnahme von Erdbeeren über die Ernährung zu einer sogenannten „Erdbeerallergie“ kommen. Dabei handelt es sich um eine Nahrungsmittelunverträglichkeit ohne Immunreaktion. An dieser Reaktion mit Nahrungsmitteln sind keine Antikörper vom Typ IgE beteiligt, aber das Gewebshormon Histamin wird trotzdem freigesetzt und verursacht die Symptome einer Allergie. Der Grund für diese Pseudoallergie ist der chininähnliche Stoff „Fragarianum“, der Hautausschlag und Schwellungen im Gesicht („Erdbeermund“) verursachen kann. Die allergische Reaktion kann umgangen werden, indem die Erdbeeren mit kochenden Wasser übergossen und anschließend mit kaltem Wasser abgeschreckt werden oder es kann Rahm zu den Erdbeeren hinzugegeben und als Fruchtquark verzehrt werden.

2 Flavonoide

Flavonoide sind Sekundärstoffe, die im Pflanzenreich weit verbreitet sind. Die Flavonoidbiosynthese in Pflanzen erfolgt ausgehend von der aromatischen Aminosäure Phenylalanin und vom Malonat. Das Grundgerüst der Flavonoide, das Flavan (2-Phenylchroman) (**Abb. 3**), besteht aus 15 Kohlenstoffatomen, die zu drei Ringen (A, B und C) miteinander verbunden sind, wobei der C-Ring einen Heterozyklus darstellt.

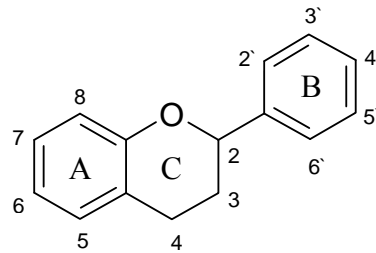


Abb. 3: Das Flavan, Grundgerüst der Flavonoide

Die verschiedenen Flavonoidklassen unterscheiden sich im Oxidationsgrad des C-Ringes bzw. im Hydroxylierungsmuster oder in der Verknüpfung der Ringe C und B. Zu nennen sind die Flavanone, Flavone, Isoflavone, Dihydroflavonole, Flavonole, Leucoanthocyanidine und Anthocyanidine (Pietta et al., 2000). Bei den Isoflavonen ist der B-Ring am C3 verknüpft. Zugeordnet sind auch die Chalkone und Aurone ohne typische Flavonoidstruktur; Chalkone besitzen keinen Heterozyklus und Aurone enthalten einen fünfgliedrigen Heterozyklus aus vier Kohlenstoffatomen. Außerdem existieren höhere Homologe, wie Proanthocyanidine und Biflavone. Innerhalb der einzelnen Flavonoidklassen unterscheiden sich die Verbindungen im Substitutionsmuster am A- und B-Ring. Zum Beispiel entsteht eine große Vielfalt an Flavonoiden durch Hydroxylierungen, Methoxylierungen, Acylierungen und Glykosilierungen.

Flavonoide sind in höheren Konzentrationen in Samen, Nüssen, Getreidekörnern, Gewürzen, in medizinisch verwendeten Pflanzen und in Getränken, wie zum Beispiel Rotwein, Tee und Bier, zu finden. Die Flavanone Naringenin (NAR) und Hesperetin kommen hauptsächlich in Zitrusfrüchten vor. Die Flavone Apigenin (Ap) und Luteolin (Lu) sind in Getreidekörnern, aromatischen Kräutern, wie Petersilie, Rosmarin und Thymian vorhanden. Die Flavonole Quercetin (Qu) und Kämpferol (Km) kommen überwiegend in Gemüse und Früchten vor. Die Flavan-3-ole (+)-Catechin (Cat), (-)-Epicatechin (Epicat), (-)-Epigallocatechine und ihre Gallensäureester kommen zum Beispiel in Teeblättern vor (Forrest & Bendall, 1969;

Lakenbrink et al., 1999). PA's sind zum Beispiel in Äpfeln, Wein, Beeren, schwarze Johannisbeeren und in Gerstenkörnern enthalten. Anthocyanidine und ihre Glykoside sind natürliche Farbpigmente, die reichlich in Beeren und rotem Wein vorhanden sind. Im Allgemeinen kommen die Flavonoide in den Pflanzen als Glykoside vor. Bislang wurde jedoch angenommen, dass Flavan-3-ole in der Natur frei (Aglykon) oder in kondensierter Form (PA's) vorkommen. Nun aber wurde aus der Samenschale von *Medicago truncatula* (*Fabaceae*) eine Glukosyltransferase (UGT72L1) kloniert und charakterisiert, die in der Lage ist (-)-Epicat, aber auch (-)-Epigallocatechin und in geringen Mengen (+)-Cat zu glukosylieren (Pang et al., 2008). Flavonoide spielen auch eine wichtige Rolle in der Pflanzenökologie. Durch ihre Farben bzw. ihre UV-Absorption agieren sie als visuelles Signal für pflanzenbestäubende Insekten (Flavone, Flavonole und Anthocyanidine). Außerdem spielen Flavonole und Cat im Abwehrsystem gegen Pflanzenschädlinge eine Rolle. In der Lichtphase der Photosynthese agieren die Flavonoide als Katalysatoren oder sind als Regulatoren der Eisenkanäle in der Phosphorylierung beteiligt. Weiterhin schützen die Flavonoide die Pflanzen vor UV-Strahlung der Sonne und fangen UV-induzierte ROS (Reaktive Sauerstoffspezies, früher „Sauerstoffradikale“) ab (Pietta et al 2000).

Die durch die Nahrung aufgenommen Flavonoide zeigen vielfältige biologische Aktivitäten. Sie sind zum Beispiel antioxidativ, antikanzerogen, entzündungshemmend, antibakteriell, antiallergisch, immunstimulierend, antiviral wirksam, aber auch durchblutungsfördernd und hemmen die PhospholipaseA₂, Cyclooxygenasen, Lipoxxygenasen, Gluthationreduktase und die Xanthinoxidase (Rice-Evans et al., 1996).

2.1 Flavonoidmuster in *Arabidopsis thaliana*

Bisher konnten in den Samen von *Arabidopsis* Wildtyp (Columbia-0, *Col-0*) Flavonolglykoside, wie zum Beispiel mono- und diglykosyliertes Qu und Km, aber auch Isorhamnetin-Derivate identifiziert werden (**Abb. 4**). Die Flavonole können mit Glukose und Rhamnose verestert sein, wobei das Qu-3-*O*-rhamnosid das Hauptflavonoid darstellt. Zusätzlich wären noch die Biflavonole zu nennen, zum Beispiel Dimere von Qu-3-*O*-Rhamnosid, aber auch von Km- und Isorhamnetinglykosiden (Routaboul et al., 2006). Im Gegensatz zu den Samen enthalten die Blätter, Stängel und Blüten vorwiegend das Km als 3-*O*-Glukosid.

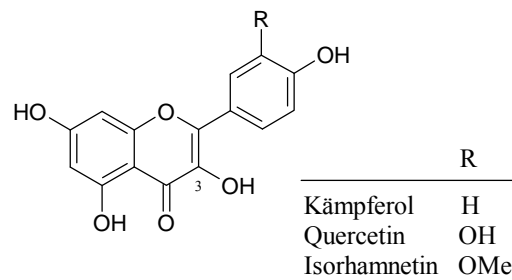


Abb. 4: Flavonole in *Arabidopsis* (Routaboul et al., 2006).

Außerdem sind in den Samen Flavan-3-ole, wie das Epicat, und die PA's, wie Procyanidin (**Abb. 5**) mit einem Polymerisierungsgrad von bis zu neun (Routaboul et al., 2006) zu finden.

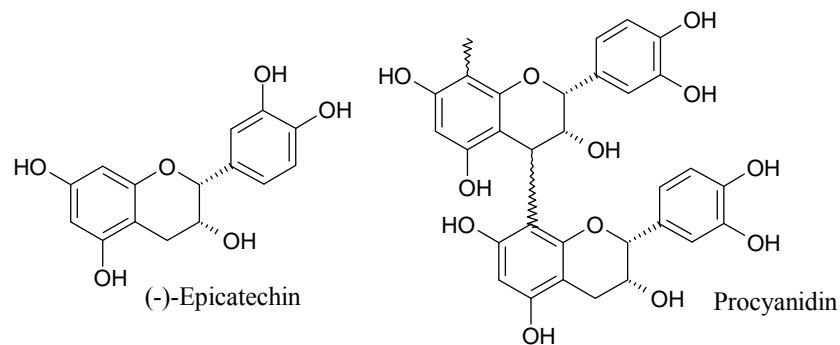


Abb. 5: (-)-Epicatechin als Beispiel für die Flavan-3-ole und Procyanidin (Routaboul et al., 2006).

In den Blättern und im Stängel von *A. thaliana* konnten zusätzlich Anthocyane nachgewiesen werden, wobei sich das Hauptanthocyan vom Cyanidin (Cy) ableitet: das Cy-3-*O*-Glukosid (**Abb. 6**).

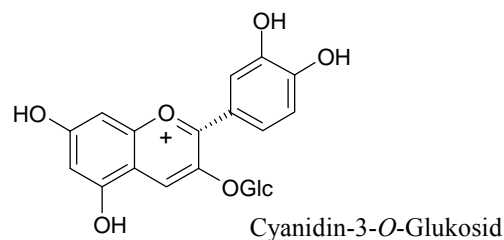


Abb. 6: Cy-3-*O*-Glukosid, das Hauptanthocyan in den Blättern und im Stängel von *Arabidopsis*.

2.2 Flavonoidmuster in *Fragaria x ananassa*

Der Flavonoidgehalt verschiedener *F. x ananassa* Sorten unterscheidet sich häufig nur quantitativ. *Fragaria* Sorten enthalten ausschließlich Km und Qu als 3-*O*-Glykoside (Bergmann et al. 1981) (**Abb. 4**). Die Flavonole können mit Glucuronsäure, Glucose oder Galactose verestert sein.

Cy und Pelargonidin (Pg) (**Abb. 7**) sind die wichtigsten Vertreter der Anthocyanidine, die als 3-*O*-Glykoside in *F. x ananassa* beschrieben sind. Pg kann mit Glucose, Arabinose und (6''-Malonyl)-Glucose verestert sein. Cy kommt im Gegensatz zu Pg nur als Cy-3-*O*-Glukosid vor, wobei das Pg-3-*O*-Glukosid das Hauptanthocyan in den Scheinfrüchten darstellt (Aaby et al., 2005).

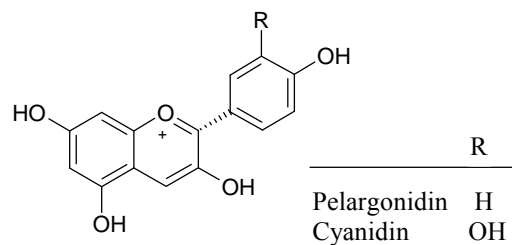


Abb. 7: Anthocyanidine in *Fragaria*

Die Flavan-3-ole in *Fragaria* bestehen hauptsächlich aus (+)-Cat und wenig (-)-Epicat (**Abb. 8**) (Almeida et al., 2007). Außerdem sind noch oligomere und polymere PA's zu finden, bei denen (+)-Cat und (-)-Epicat als Erweiterung- und Terminationseinheiten dienen.

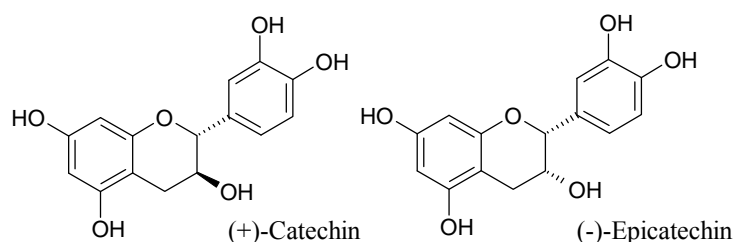


Abb. 8: Flavan-3-ole in *Fragaria*

2.3 Pharmazeutisch bedeutende Eigenschaften von Flavonolen und Proanthocyanidinen

2.3.1 Antioxidative Eigenschaften

Durch genügend Obst und Gemüse in der Ernährung kann einer Vielfalt von Krankheiten, wie zum Beispiel Herzkreislauferkrankungen und einigen Arten von Krebs, vorgebeugt werden. Als eine Ursache für diese Erkrankungen werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) angenommen, die bei normalen oxidativen Prozessen im menschlichen Organismus gebildet werden. ROS können die DNA, Proteine, Lipide oder die Zellmembran schädigen und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs, Arteriosklerose, Diabetes und bei chronischen Entzündungen. Obwohl der menschliche Organismus verschiedene Schutzmechanismen gegen Schäden durch ROS besitzt, bieten Antioxidantien aus der Nahrung einen zusätzlichen Schutz. Neben den Vitaminen A, C, E und Carotin besitzen auch die Flavonoide, wie zum Beispiel Flavonole, Flavan-3-ole und PA's, antioxidative Eigenschaften (Ross et al., 2002) mit der Fähigkeit, Peroxid-, Alkylperoxid- und Superperoxidhydroxylradikale, sowie Peroxynitrite im wässrigen und organischen Milieu des menschlichen Körpers abzufangen. Die Flavonoide können besonders leicht ein Wasserstoffatom aus ihren phenolischen Gruppen freisetzen und einzelne Elektronen abgeben (Ross et al., 2002). Durch diese radikalische Reaktion erlangt das gebildete Flavonoidradikal eine stabile Chinonstruktur (**Abb. 9**).

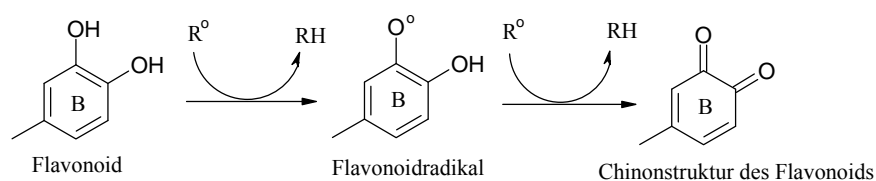


Abb. 9: Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Flavonoide (Pietta et al., 2000)

In diesem Zusammenhang sind die Hydroxylgruppen an C3' und C4' des B-Ringes, sowie die Doppelbindung zwischen C2 und C3, das C4 Keton und die Hydroxylgruppe an C3 des C-Ringes von Bedeutung. Außerdem sind Flavonoide in der Lage, ROS-bildende Enzyme, wie zum Beispiel die Xanthinoxidase, Proteinkinase C, Lipooxygenase, Cyclooxygenase, Glutathion S-Transferase, mitochondriale Succinoxidase, NADPH-Oxidase und die mikrosomale Monooxygenase, zu hemmen (Pietta et al., 2000). Eine weitere wichtige

antioxidative Eigenschaft besteht in der Fähigkeit, durch ihre Catecholstruktur im B-Ring Übergangsmetalle, wie zum Beispiel Eisen und Kupfer, zu komplexieren und dadurch die ROS-Bildung zu vermindern (**Abb. 10**) (Thompson et al., 1976).

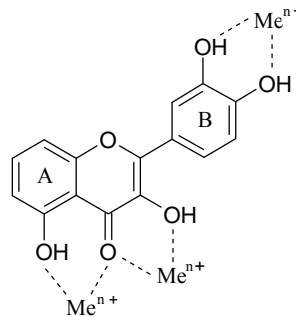


Abb. 10: Komplexierung von Übergangsmetallionen durch Flavonoide (Pietta et al., 2000)

Weiterhin zeigten Studien, dass die Aglyka Qu, Myricetin und Km, gegenüber ihren Glykosiden Qu-3-*O*-Glukosid, Quercitrin (Qu-3-*O*-Rhamnosid) und Rutin (Qu-3-*O*-Rutinosid), eine bessere antioxidative Wirkung aufweisen (Ross et al., 2002). Die Ursache für das Nachlassen der antioxidativen Wirkung durch Glykosylierung ist zum Einen die Blockierung der Hydroxygruppe am C3, das als Radikalfänger und Komplexbildner beteiligt ist und zum Anderen die verminderte Membrangängigkeit des großen Glykosids. Außerdem konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel Flavonole stärker antioxidativ wirksam sind als Flavone und dass Flavanone und Dihydroflavonole nur schwach antioxidativ wirken, was sich durch die bereits beschriebenen Strukturmerkmale erklärt (**Abb. 11**). Untersuchungen von grünem Tee (*Camellia sinensis* L., Theaceae) ergaben, dass das (-)-Epigallocatechingallat (EGCG), Hauptbestandteil vom grünen Tee, eine signifikante antioxidative Wirkung aufweist (Ahmad et al., 2000). Dadurch können Herz-Kreislauf-Erkrankungen vermindert, aber auch die Haut geschützt und Krebserkrankungen vorgebeugt werden (Nagle et al., 2006). Studien mit dunkler Schokolade ergaben, dass sie einen hohen Gehalt an (-)-Epicat besitzen. (-)-Epicat soll ebenfalls vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen schützen, wobei vermutlich ein erhöhter (-)-Epicatechinlevel das antioxidative Potential des Blutplasmas steigert (Serafini et al., 2003). Die antioxidative Eigenschaft von Extrakten aus den Kernen der Weintraube (GSPE, Grape Seed Proanthocyanidin-rich Extract) wurde in zahlreichen Tier- und Zellmodellsystemen nachgewiesen und *in vivo* ist das antioxidative Potential von GSPE wesentlich größer als das von Vitamin C, E und β -Carotin (Bagchi et al., 2000). Außerdem

soll GSPE auch vor Arteriosklerose schützen (Vinson et al. 2002). Die antioxidativen Flavonoide, die in Früchten, Gemüse, Tee und Wein vorkommen, hemmen *in vitro* auch die Oxidation von LDL (Low-Density-Lipoprotein). Dies wiederum führt zu einer Verbesserung von Herzkreislauffunktionen und reduziert somit das Risiko entsprechender Erkrankungen. Zum Beispiel hemmen die in Rotwein vorhandenen Flavonoide, wie Cat, Epicat und Qu, die kupferkatalysierte Oxidation von LDL und das antioxidative Potential von Epicat und Qu ist zweimal höher als das des Resveratrols (Harborne et al., 2000).

2.3.2 Antikanzerogene Eigenschaften

Obwohl der antioxidative Effekt von Flavonoiden nicht streng von den antikanzerogenen Eigenschaften zu trennen ist, zeigen epidemiologische Studien („Zyphten Elderly Studie“), dass der Verzehr von Früchten und Gemüse das Risiko an sehr unterschiedlichen bösartigen Tumoren und, zum Beispiel an Darm, Brust, Lungen, Kehlkopf, Bauchspeicheldrüsen, Magen und oralen Krebsarten zu erkranken, verringern kann. Das weist auf mehr als einen Effekt hin, allerdings können die unterschiedlichen Resultate vieler Studien aus verschiedenen Ländern kaum verallgemeinert werden (Ross et al., 2002). Flavonoide können die Aktivitäten von Cytochrom-P450-Monooxygenasen verändern und so den Phase I Metabolismus von Xenobiotika bzw. die Aktivierung von möglichen Prokanzerogenen beeinflussen oder verhindern. Das Benzo[a]pyren, ein sogenanntes Prokanzerogen, wird durch Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP1A1 zum Mutagen oxidiert und induziert selbst über den Transkriptionsfaktor Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) die Transkription von CYP1A1. Km und Qu wirken als AhR-Rezeptor Antagonist, indem sie an AhR binden und die CYP1A1-Aktivität hemmen. Der Extrakt von *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae) Rinde besitzt antimutagene Eigenschaften, welche auf die enthaltenen PA's zurückzuführen ist. Diese PA's schützen vor Benzo[a]pyren-induzierten DNA-Schäden und können zum Beispiel die begleitenden Hautirritationen reduzieren (Dauer et al., 2003). Qu, Km und Myrcetin sind potentielle Inhibitoren der Phenolsulfotransferase (PST) vermittelten Sulfatierung von Acetaminophen und Mioxidol im Cytosol menschlicher Leberzellen. Zusätzlich ist Quercetin auch an der Hemmung der Sulfokonjugation von Hep G2 Zellen involviert. Außerdem sind Flavonoide an der Induktion von Enzymen des Phase II Metabolismus beteiligt, wie zum Beispiel Glutathion S-Transferase, NAD(P)H-Chinonoxoreduktase (NQO) und UDP-Glucuronyltransferase. Dadurch können potentielle Kanzerogene besser eliminiert werden

(Galati et al. 2004). Die Effektivität der Induktion von NQO durch Flavonole nimmt in der Reihenfolge Km, Qu zu Myrcetin ab, wohingegen Cat und Epicat keine Aktivität zeigen. Weiterhin spielen Flavonoide eine wichtige Rolle bei der Regelung der Zellproliferation, Angiogenese und Apoptose (Middelton et al., 2000). Sie können die Topoisomerasen I und II hemmen, wobei Qu und Myrcetin die Topoisomerasen I und II unspezifisch hemmen. Km dagegen hemmt nur die Topoisomerase II. Die Topoisomerase II-Hemmung wird in zwei Klassen unterteilt: erstens als zytotoxischer Wirkstoff (Topoisomerasegifte) und zweitens als Topoisomerase II-Antagonisten. Flavonoide können bei der Hemmung abhängig von der Position der Hydroxylgruppen am A- und B-Ring sowohl als Topoisomerasegift, Antagonist oder auch als beides agieren. Die Hemmung der Topoisomerasen I und II durch Flavonoide erfordert ein bestimmtes Hydroxylmuster, zum Beispiel Hydroxylierung am C3, C7, sowie C3' und C4' (**Abb. 3**). Allerdings hemmt Cat, das das gleiche Hydroxylierungsmuster wie Qu zeigt, die Topoisomerasen I und II nicht. Demnach spielt auch die Ketogruppe am C4 des C-Ringes eine wichtige Rolle für die Hemmung. Rutin zeigt die gleiche Grundstruktur, aber keine Topoisomerase I oder II Hemmung, da hier die Hydroxygruppe am C3 glykosyliert ist (Constantinou et al., 1995). Außerdem ergaben Untersuchungen, dass Östrogene als Risikofaktoren an der Bildung von einigen Krebsarten beteiligt sind. Flavonoide werden als nicht östrogen bzw. schwach östrogen wirksam betrachtet. Flavonole, wie Km, agieren durch einen Östrogen-Rezeptor (β -Rezeptor) vermittelnden Mechanismus und zeigen antiöstrogene Effekte. Sie werden dadurch als potentielle Brustkrebstherapeutika gehandelt (Ross et al., 2002).

2.3.3 Immunmodulierende Eigenschaften

Die immunregulierende Wirkung von Flavonoiden wurde durch *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen studiert. Dabei wurden Enzyme, die an der Immunantwort beteiligt sind, moduliert oder Lymphozyten direkt beeinflusst. Die an der Immunantwort beteiligten Enzyme sind Cyclooxygenasen, Lipxygenasen, Protein- und Proteintyrosinkinasen. Die Kinasen werden wahrscheinlich an den ATP-Bindungsstellen gehemmt, wodurch die Cytokinausschüttung reduziert wird. Außerdem konnte in *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass Flavonole, Anthocyane oder PA's die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) oder Interleukin-6 (IL-6), stimulieren (Pagonis et al., 1986). Außerdem hemmt Qu die Aktivität von natürlichen

Killerzellen und unterdrückt die Antigenstimulation von cytotoxischen T-Lymphocyten. Diese anti-inflammatorische Wirkung beruht auf den antioxidativen Effekt auf den NO-Stoffwechsel bzw. auf entzündungsfördernden Enzymen, wie Cyclooxygenasen oder Lipooxygenasen. Weiterhin kann Qu die Aktivität von Phospholipase A₂ herabsetzen, einem wichtigen Enzym für die Freisetzung von Arachidonsäure und Prostaglandin. Zusätzlich kann Qu zusammen mit Curcumin bei der Heilung nach einer Transplantation eingesetzt werden (Harborne et al., 2000). Die anti-inflammatorische Wirkung des Anthocyans Cy-3-O-Glukosid aus Sauerkraut (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*, Brassicaceae) soll angeblich die Schmerzen bei Arthritis und Gicht lindern und wurde näher untersucht. Dabei zeigte sich eine Hemmung von Prostaglandin-Endoperoxidhydrogensynthase 1 und 2 (PGHS 1 und 2) (Harborne et al., 2000). Der Extrakt von *Ecdysanthera utilis* (Apocynaceae), enthält das PA Procyanidin A₁ und zeigt immunmodulierende Wirkung. In der taiwanesischen Volksmedizin wird es als analgetisches, antiphlogistisches und als spasmolytisches Mittel eingesetzt. Das Procyanidin A₁ soll die Interferon- γ - und die Interleukin-2-Produktion blockieren (Lin et al., 2002).

2.3.4 Antibakterielle und antivirale Eigenschaften

Bestimmte Flavonoide, besonders Isoflavonoide, können die Pflanze vor dem Befall von Mikroorganismen schützen und werden auch als Phytoalexine bezeichnet. Sie sind antifungal, antibakteriell und antiviral wirksam. Das Interesse an Flavonoiden hinsichtlich der Behandlung von menschlichen Erkrankungen nahm in den letzten Jahren stetig zu. Einige humanpathogene Bakterien können durch Flavonoide getötet werden, zum Beispiel durch die direkte Hemmung der Topoisomerasen (2.3.2) oder die Hemmung metallabhängiger Enzyme durch Komplexbildung von Kofaktoren. Die Flavan-3-ole Cat, Epicat, Epigallocatechin und Gallocatechin, sowie die PA's weisen neben antioxidativen Wirkungen auch antibakterielle Eigenschaften auf. Sie wirken zum Beispiel gegen Lebensmittelpilze wie *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* und *Penicillium cyclopium*, aber auch gegen krankheitserregende Bakterien wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* (Majhenič et al., 2007; Lee et al., 2006). Die PA's des Typ A sollen außerdem die Harnwege vor harnwegsentzündenden Bakterien schützen (Kandil et al., 2002). Einige Flavonoide, wie Qu, können auch antiviral wirksam sein. *In vitro* wirkt Qu gegen Herpes simplex Virus Typ I, Parainfluenza Virus Typ 3, RS-Virus, Sindbis-

Virus oder Tollwut. Diese Wirkung beruht möglicherweise auf der Fähigkeit virale Proteine zu binden oder die Nukleinsäuresynthese zu beeinflussen.

2.4 Bedeutungen von Flavonolen und Proanthocyanidine für die Pflanze

Eine wichtige Funktion der Flavonoide in der Pflanze ist die Färbung von Blüten, Früchten und anderen Pflanzenteilen. Die Färbung erfolgt überwiegend durch die lipophilen Carotinoide (gelb-rot) und die wasserlöslichen Flavonoide, besonders die Flavonolglykoside (gelb) und die Anthocyane (rot-blau). Die Bedeutung der Blütenfarbe besteht in der Anlockung von Bestäubern, vor allem von Insekten. Bei Anthocyanen verursacht der pH-Wert und die Co-Pigmentierung durch andere Flavonoide und Cat eine Farbvertiefung. Aber auch die Komplexierung mit Metallionen (z.B. Eisen, Aluminium und Magnesium) spielt zum Beispiel bei der Blaufärbung eine wichtige Rolle (Harborne et al., 2000). Eine weitere wichtige Funktion der Flavonoide in Pflanzen ist der Schutz vor schädlichen UV-B Strahlen. Flavonoide befinden sich häufig in der oberen Epidermis und sind in der Lage die UV-B Strahlung (280-315 nm) zu absorbieren. Untersuchungen an Mutanten von *Arabidopsis* (Li et al., 1993), *Petunia* (Ryan et al., 2002) und Reis (Markham et al., 1998) beweisen die Schutzfunktion vor schädlicher UV-Strahlung. Vor allem die Flavonole befinden sich in der Epidermis von Blättern, und durch ihre Absorptionsmaxima bei 250-285 nm (durch den A-Ring) und 320-385 nm (durch den B-Ring) können Flavonole als Schutzpigmente die UV-B Strahlung am besten absorbieren. Die Synthese dieser Schutzpigmente selbst wird in der Regel durch die UV-Strahlung angeregt. Dadurch kann der größte Teil der UV-Strahlung absorbiert und die darunter liegenden photosynthetisch aktiven Gewebe geschützt werden. Schäden an der DNA, RNA sowie an Proteinen können dadurch verhindert werden.

Flavonoide, insbesondere Flavonole oder Flavone (Martens & Mithöfer, 2005), können auch als Signalstoffe zwischen Pflanzen und Insekten fungieren. Zum Beispiel legen einige Schmetterlingsarten ihre Eier auf Pflanzen ab, die bestimmte Flavonolderivate absondern (Harborne et al., 1994). Zusätzlich sind die Flavonole auch für das Pollenschlauchwachstum und für die Samenbildung in einigen Pflanzen erforderlich. Flavonoide, wie die PA's, können zudem als Schutz gegen Herbivoren wirken. Geschmack und adstringierende Wirkung der PA's wehren die pflanzenfressenden Insekten ab (Harborne et al., 2000). Zu niedrige Konzentrationen an PA's in Futterpflanzen sind unerwünscht und können zum „bloating“ bei Rindern führen, wohingegen hohe Konzentrationen an PA's Schmackhaftigkeit negativ

beeinflussen und durch das Binden von bakteriellen Enzymen oder Komplexbildung mit Zellwandpolysacchariden auch negative Auswirkungen auf den Nährwert einschließlich der Verdauung haben (Reed et al., 1995).

Ebenso wie Isoflavonoide können Flavonole, Flavan-3-ole und PA's eine Rolle als Phytoalexine spielen (Harborne et al., 2000; Gonzalez de Colmenares et al., 1998; Ahmad et al., 2000; Ardi et al., 1998). PA's können zusätzlich Metalle durch ihre komplexen Catecholgruppierungen binden. Das Bakterienwachstum kann so durch Chelatisierung von Eisen gestoppt werden. Die Eisenbindung repräsentiert einen wichtigen Mechanismus für die antibakterielle Wirkung von PA's (Scalbert et al., 1991). Die Eigenschaft, Metalle zu binden und zu speichern, könnte zudem ein Vorteil für die Pflanze sein. *Lotus pedunculatus* (Fabaceae) kann zum Beispiel toxische Aluminiumkonzentrationen durch Speicherung in Tannin-reichen Vakuolen in den Wurzeln tolerieren (Stoutjesdijk et al., 2001).

Aber nicht alle Effekte von PA's sind für die Pflanze von Nutzen. Zum Beispiel agieren die PA's in der Rinde von *Pinus densiflora* (Pinaceae) als Eiablage-Stimulans für den Bockkäfer (*Monochamus alternatus*) (Sato et al., 1999).

2.5 Flavonoidbiosynthese

In den letzten Jahren wurden die Enzyme der Flavonoidbiosynthese (**Abb. 11**) in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen und eingehend biochemisch und molekularbiologisch untersucht, wodurch auch die entsprechenden cDNA und genomischen Klone isoliert und charakterisiert werden konnten (Dooner et al., 1991; Forkmann & Heller, 1999; Winkel-Shirley et al., 2001; Xie et al., 2005). Die meisten phenolischen Verbindungen, wie auch die Flavonoide, leiten sich von der Aminosäure L-Phenylalanin ab. Im Phenylpropanstoffwechsel wird das L-Phenylalanin aus dem Shikimatweg durch die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) zu *trans*-Zimtsäure desaminiert und dann durch Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) und 4-Cumarat:CoA-Ligase (C4L) zu 4-Cumaroyl-CoA umgesetzt (**Abb. 11**). Die Chalkonsynthase (CHS) nutzt 4-Cumaroyl-CoA als Startersubstrat und kondensiert es mit drei Molekülen Malonyl-CoA, das durch die Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase) aus Acetyl-CoA geliefert wird, zum gelbfarbenen Tetrahydroxychalkon (Naringeninchalkon). CHS ist eine Polyketidsynthase, die gleichzeitig mit der Polykondensation eine Cyclisierung der Malonyl-Reste unter Decarboxylierung zum A-Ring durchführt. Das Naringeninchalkon wird durch die Chalkonisomerase (CHI) zum farblosen (2*S*)-Flavanon, dem NAR umgesetzt, so dass der Phenylring aus 4-Cumaroyl-CoA den B-Ring bildet. Erst dabei entsteht der Flavangrundkörper der Flavonoide (**Abb. 11**). Das Chalkon isomerisiert bei Raumtemperatur zu einem Gemisch von (2*S*/2*R*)-Flavanonen, aber unter dem Einfluss der CHI erfolgt die Bildung der (2*S*)-Flavanone stereospezifisch. Auf Ebene der Flavanone verzweigt sich die Flavonoidbiosynthese und es können Dihydroflavonole oder Flavone und ihre Folgeprodukte gebildet werden. Die Hydroxylierung an C3 zu Dihydroflavonolen erfolgt durch die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase (2-ODD) Flavanon 3 β -Hydroxylase (FHT, syn. F3H), wohingegen zwei Typen von Flavonsynthasen (FNS I/II) Flavanone zu Flavonen oxidieren (**Abb. 11**). Beide Enzyme führen eine Doppelbindung zwischen dem C2 und C3 des C-Ringes ein (Martens & Forkmann, 1999; Martens et al., 2001; Gebhardt et al., 2005). Die FNS I gehört wie die FHT zu den 2-ODD's (Britsch et al., 1981), und die FNS II ist eine Cytochrom-P450-Monooxygenase (Xu et al., 2007). Auch auf der Stufe der Dihydroflavonole verzweigt sich der Weg, indem einerseits die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) zu den farblosen, instabilen Leucoanthocyanidinen (Flavan-3,4-diole) führt und andererseits die Flavonolsynthase (FLS), ebenfalls eine 2-ODD, gelbe Flavonole bildet (**Abb. 11**). Bei der Bildung von Leucoanthocyanidinen wird das C4 Carbonyl zum Hydroxyl reduziert und bei

den Flavonolen wird eine Doppelbindung, analog zur FNS Reaktion, zwischen dem C2 und C3 des C-Ringes eingeführt (**Abb. 11**). Die Leucoanthocyanidine können durch die Leucoanthocyanidin 4-Reduktase (LAR) zu *trans*-Flavan-3-olen umgewandelt werden (Stafford et al., 1984). Hierbei wird an C4 dehydratisiert. Sie können aber auch durch die Anthocyanidinsynthase (ANS, syn. Leucoanthocyanidindioxygenase, LDOX), ebenfalls eine 2-ODD, zu den farbigen Anthocyanidinen umgesetzt werden (Saito et al., 1999). Die Anthocyanidine können anschließend durch die Flavonoid 3-*O*-glycosyltransferase (FGT) zu Anthocyanen umgesetzt werden, wodurch eine Stabilisierung erfolgt. Andererseits können sie auch durch die Anthocyanidinreduktase (ANR) zu *cis*-Flavan-3-olen umgewandelt werden (Xie et al., 2004). Hydroxylierungen des B-Ringes auf Ebene der verschiedenen Flavonoidklassen werden durch die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) und die Flavonoid-3',5' Hydroxylase (F3',5'H) durchgeführt. Diese beiden Enzyme gehören wie die FNS II zu den membrangebundenen NADPH-abhängigen Cytochrom P450-Proteinen und bestimmen das Hydroxlierungsmuster am B-Ring. Flavanone, Dihydroflavonole, Flavonole, aber auch Leucoanthocyanidine können darüber als Substrate hydroxyliert werden (Jeong et al., 2006; Xu et al., 2007)

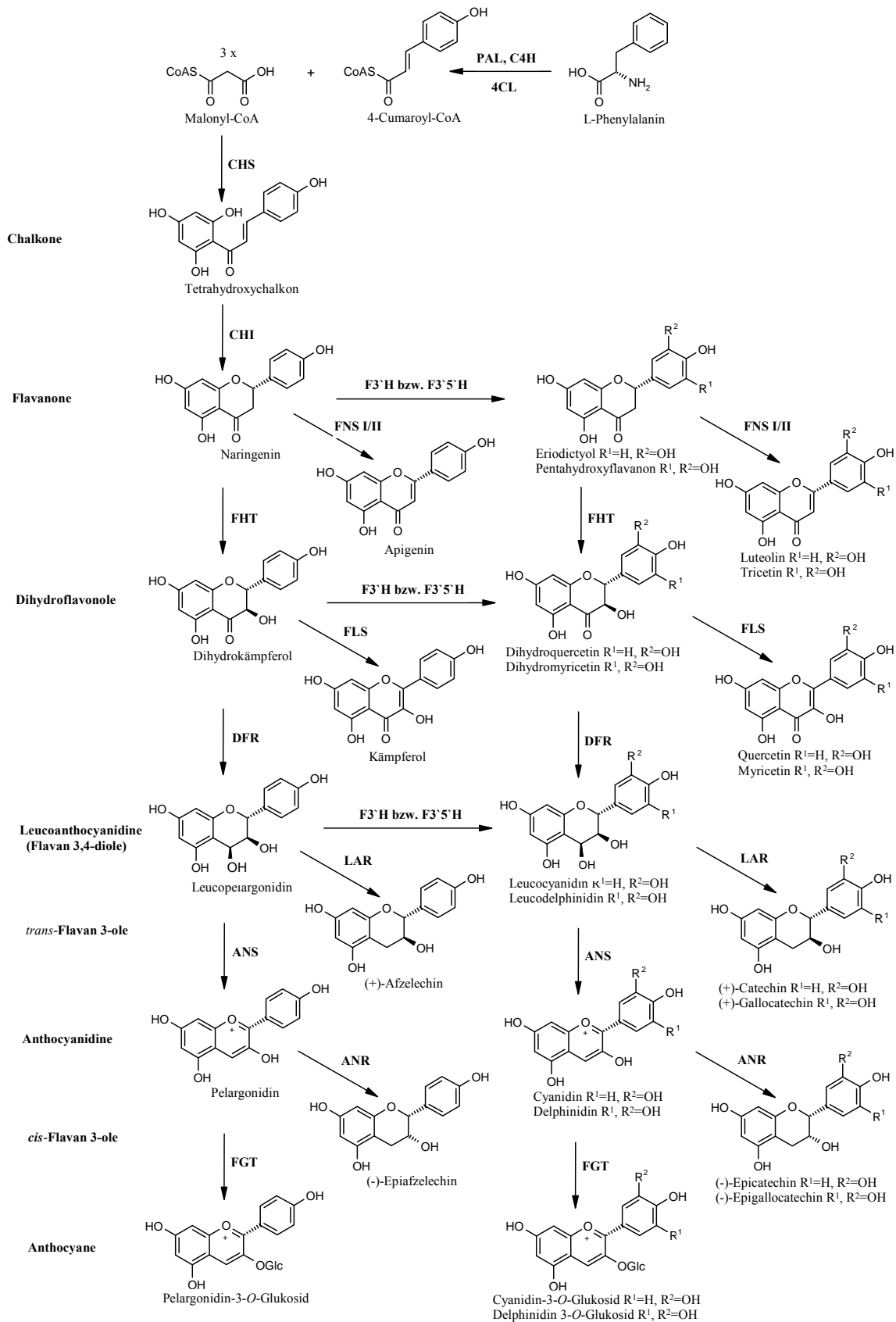


Abb. 11: Flavonoidbiosynthese

2.5.1 Biosynthese von Flavonolen

Die Oxidation von Dihydroflavonolen zu Flavonolen erfolgt *in vivo* durch die FLS (**Abb. 11**), die zu den 2-ODD's gehört (Turnbull et al., 2004). Die FLS-Aktivität wurde erstmalig im Proteinextrakt von Petersilienzellkulturen (*Petroselinum crispum*, Apiaceae) nachgewiesen (Britsch et al., 1981). Später folgten FLS-Nachweise in Blütenextrakten von *Matthiola incana* (Brassicaceae) (Spirbille & Forkmann et al., 1984), *Petunia hybrida* (Solanaceae) (Forkmann et al., 1986) und *Dianthus caryophyllus* (Caryophyllaceae) (Forkmann et al., 1991). Die erste FLS cDNA wurde aus *P. hybrida* isoliert, und mittels funktioneller Expression in Hefen charakterisiert (Holton et al., 1993). Später wurden weitere FLS Sequenzen aus verschiedenen Pflanzen isoliert und mittlerweile liegen die FLS cDNAs von *A. thaliana* (Pelletier et al., 1997), *Eustoma russellianum* (Gentianaceae), *Solanum tuberosum* (Solanaceae) (van Eldik et al., 1997), *M. incana*, *Malus domestica* (Rosaceae) (Moriguchi et al., 2002), *Citrus unshiu* (Rutaceae) (Moriguchi et al., 2002) und einigen anderen Pflanzen vor.

Ein weiteres Enzym das an der Flavonolbiosynthese beteiligt sein könnte, wäre die Anthocyanidinsynthase (ANS, syn. LDOX). Die ANS gehört, wie die FLS, zu den 2-ODDs, und beide Enzyme bestehen aus Proteinsequenzen von 50 - 60% Ähnlichkeit (Turnbull et al., 2004). *In vivo* katalysiert die ANS die Umsetzung von (2*R*,3*S*,4*S*)-*cis*-Leucoanthocyanidinen zu Anthocyanidinen (Saito et al., 1999). Bis heute wurden ANS cDNA's von *Zea mays* (Poaceae) (Menssen et al., 1990), *Antirrhinum majus* (Plantaginaceae) (Martin et al., 1991), *Malus sp.* (Davies et al., 1993), *P. hybrida* (Weiss et al., 1993), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) (Sparvoli et al., 1994), *A. thaliana* (Pelletier et al., 1997) und *Perilla frutescens* (Lamiaceae) (Saito et al., 1999) und anderen Pflanzen isoliert und charakterisiert. Eine ANS-Enzymaktivität konnte jedoch bis jetzt noch nicht in Pflanzenextrakten nachgewiesen werden. Der Grund für den fehlenden Nachweis könnte durch die Instabilität der Substrate, den (2*R*,3*S*,4*S*)-*cis*-Leucoanthocyanidinen erklärt werden.

In vitro zeigen sowohl die FLS als auch die ANS eine Multifunktionalität. So katalysiert die FLS nicht nur die eigentliche Umsetzung von (+)-*trans*-DHK zu Km, sondern sie kann sowohl das (2*S*)-NAR als auch das unnatürliche Isomer (2*R*)-NAR zum (+)-*trans* bzw. (-)-*trans* DHK umsetzen (Lukačín et al., 2003). Bei dieser Reaktion findet eine *trans*-Hydroxylierung von (2*S*)- bzw. (2*R*)-NAR am C3 statt (**Abb. 12**) (Lukačín al., 2003). Anschließend wird nur das (+)-*trans*-DHK zum Km durch die FLS umgesetzt. Demnach könnte die FLS die FHT-Reaktion, Umsetzung von (2*S*)-NAR zu (+)-*trans*-DHK, in einer

FHT-Mutante (*in vivo*) übernehmen und die Mutante wäre dadurch eventuell überlebensfähig (Bildung von Flavonolen als UV-Schutz u. a.).

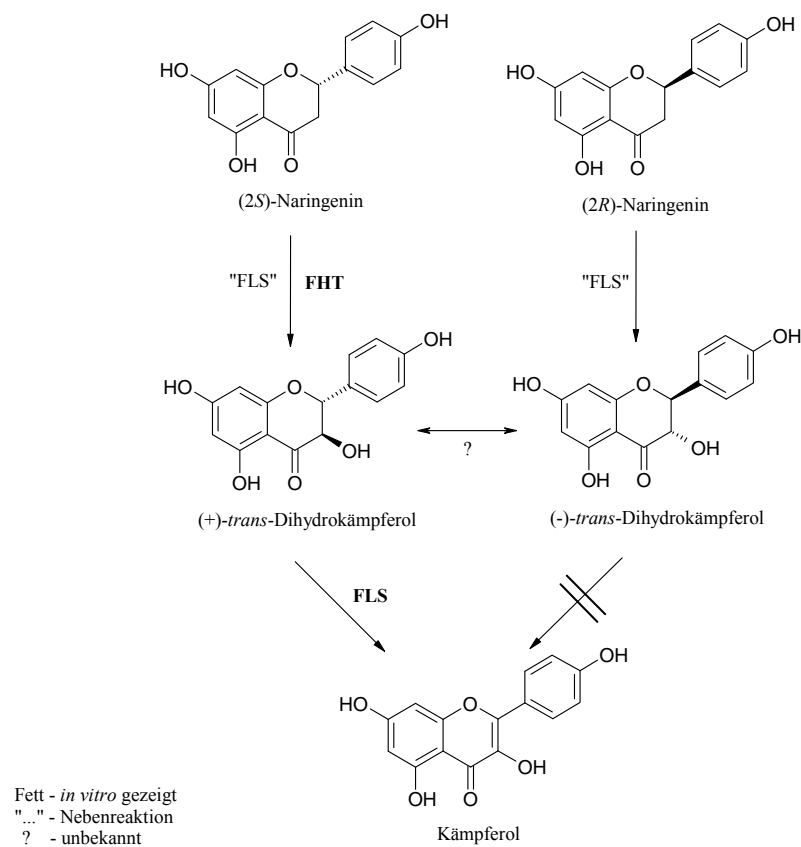


Abb. 12: Flavonolbiosyntheseweg katalysiert durch die FLS nach Lukačín et al., 2003.

In vitro assays mit rekombinanter ANS (**Abb. 13**) und (2R,3S,4S)-*cis*-Leucocyanidin (Lcy) als Substrat lieferten sowohl Cy (< 2%) als auch Qu (85%) (Turnbull et al. 2004). Die ANS katalysiert *in vitro* auch die Reaktion von Dihydroquercetin (DHQ) oder DHK zu Qu bzw. Km, die *in vivo* durch die FLS katalysiert wird (Welford et al., 2001). „Loss-of-function“ Mutationen der ANS in *A. majus* führten zum Verlust von Anthocyanen, wodurch die Beteiligung der ANS an deren Biosynthese *in vivo* nachgewiesen werden konnte

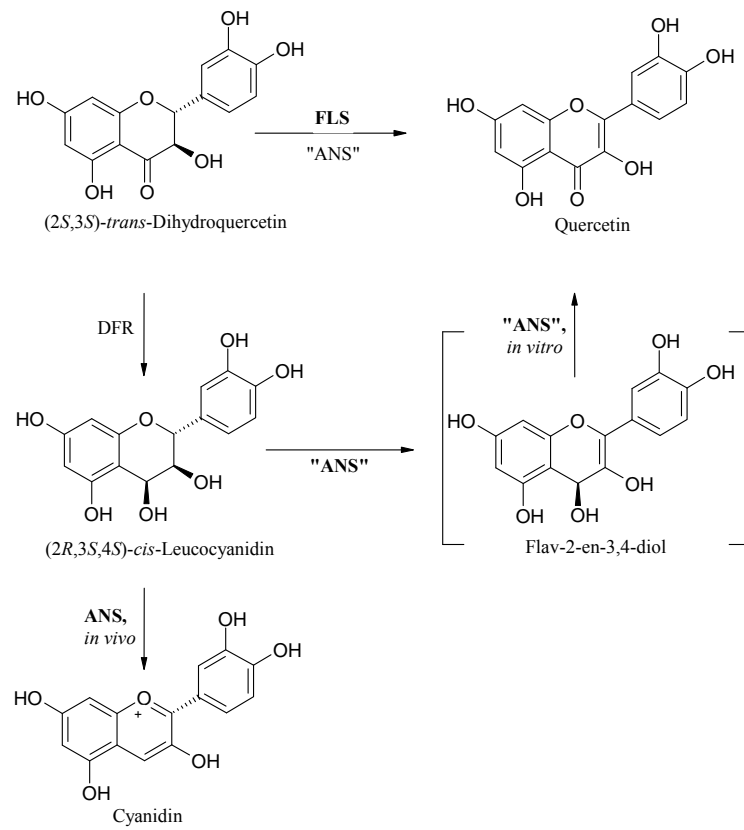


Abb. 13: *In vivo* und *in vitro* Reaktionsweg der ANS (Turnbull et al. 2004)

2.5.2 Reaktionsmechanismus von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODD's)

Die 2-ODD's gehören zu den intermolekularen Dioxygenasen (**Abb. 14**), die ein Sauerstoffatom in Form einer Ferrylspezies für die Oxidation des Substrates aktivieren. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Häm-freie Enzyme, die zusätzlich zu Eisen und 2-Oxoglutarat noch Ascorbat für ihre Aktivität benötigen können. Die dafür erforderlichen Elektronen werden durch die Übertragung des zweiten Sauerstoffatoms auf 2-Oxoglutarat mit Decarboxylierung zu Succinat geliefert.

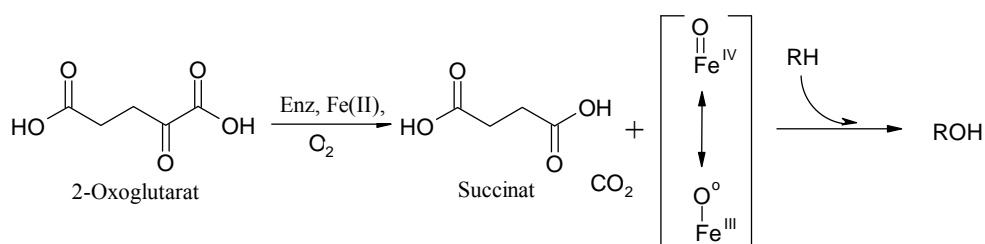


Abb. 14: Allgemeiner Reaktionsmechanismus von 2-ODD's (Turnbull et al., 2004)

Die 2 ODD's können Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Desaturierungen, Ringschlüsse und Ringerweiterungen katalysieren (Schofield et al., 1999), aber auch schrittweise Methylgruppen über Alkohole, Aldehyde zu Carbonsäuren oxidieren. Sie kommen sowohl in Mikroorganismen, als auch in Tieren und Pflanzen vor. Sie sind in primären und sekundären Synthesewegen vertreten. Die Isopenicillin N Synthase (IPNS) und die Deacetoxycephalosporin C Synthase (DAOCS), beide an der β -Lactamantibiotika Synthese beteiligt, sowie die Clavaminsynthase (CAS), die den β -Lactamasehemmer Clavulansäure bildet, gehören zu den 2-ODD's in Mikroorganismen. Obwohl die IPNS aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu den 2-ODD's gehört, benötigt sie für ihre Aktivität kein 2-Oxoglutarat (Prescott and Lloyd, 2000). Die Kristallstrukturen der IPNS, DAOCS und CAS liegen mittlerweile vor und bilden die Basis für Hypothesen hinsichtlich des Reaktionsmechanismus der verschiedenen 2-ODD's. Bei den Säugetieren ist die am besten untersuchte 2-ODD die Prolyl-4-hydroxylase (P4H). Die P4H ist an der Carnitin und Kollagenbiosynthese beteiligt und katalysiert die post-translationale Hydroxylierung von Prolinresten im Kollagen (Schofield et al., 1999). In der Pflanze sind die 2-ODD's zum Beispiel in der Alkaloidbiosynthese zu finden. Die Hyoscyamin 6 β -hydroxylase (H6H) hydroxyliert und epoxidiert Hyoscyamin zu Scopolamin. Die H6H cDNA konnte bereits aus *Hyoscamus niger*

(Solanaceae) und *Atropa belladonna* (Solanaceae) isoliert werden. Die Desacetoxyvindolin 4-hydroxylase (D4H) hydroxyliert das Deacetoxyvindolin zum Desacetylvindolin, einem Zwischenprodukt bei der Biosynthese der cytotoxischen Alkaloide Vinblastin und Vincristin. Die D4H cDNA konnte aus *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) isoliert und in *E. coli* exprimiert werden (Vazquez-Flota et al., 1997). An der Gibberellinsynthese (Phytohormon) ist die Gibberellin 20-Oxidase beteiligt. Diese 2-ODD oxidiert Methylgruppen von Gibberellinen schrittweise zu Alkoholen und Aldehyden, aber auch die weitere Oxidation zur Carbonsäure und Eliminierungen durch Decarboxylierungen sind möglich. Weitere 2-ODD's sind in diesem Biosyntheseweg die Gibberellin 3 β -Hydroxylase, die Gibberellin-2 β , 3 β -Hydroxylase und die Gibberellin 2 β -Oxidase. Auch an der Ethylenbiosynthese ist eine 2-ODD, die 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Oxidase (ACCO) beteiligt. Diese setzt die 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure zu Ethylen, Blausäure, Wasser und CO₂ um. Wie schon bei der IPNS, benötigt die ACCO auch kein 2-Oxoglutarat und wird trotzdem als 2-ODD klassifiziert. Aus der Flavonoidbiosynthese sind bis heute fünf 2-ODD's bekannt, die FHT, FNS I, FLS, ANS und die Flavonol 6-Hydroxylase (F6H) (Boudet, 2007).

Obwohl 2-ODD's unterschiedliche Reaktionen katalysieren, besitzen alle Gemeinsamkeiten in der Struktur und im Reaktionsmechanismus. In den bisher kristallisierten 2-ODD's befindet sich das aktive Zentrum in einem sogenannten „jelly-roll“-Motiv, das aus zwei β -Faltblattstrukturen aus je vier Strängen besteht. Im Allgemeinen benötigen die Dioxygenasen für die Aktivierung des Sauerstoffs Eisen oder andere Übergangsmetalle. Röntgenstrukturanalysen, spektroskopische Untersuchungen und Mutagenesestudien konnten zwei konservierte Kofaktorbindungsmotive identifizieren. Das Eisenbindungsmotiv besteht aus der Abfolge von Histidin (H), einer nicht konservierten Aminosäure (x), einem Aspartat (D) oder Glutamat (E) und einem zweiten Histidin (H) (H x D/E...-H Motiv). Das 2-Oxoglutaratbindungsmotiv setzt sich aus Arginin (R), einer nicht konservierten Aminosäure (x) und Serin (S) zusammen (R x S Motiv). Das 2-Oxoglutarat bindet dabei mit der Carboxylgruppe an das R x S Motiv (Schofield et al., 1999). Die Oxidation des Substrates findet formal durch eine Ferrylspezies (Fe(IV)=O) statt (Schofield et al., 1999; Solomon et al., 2000). Das Fe(II) liegt vor der Bindung des 2-Oxoglutarates in einer oktaedrischen Anordnung im aktiven Zentrum vor und bindet an drei Aminosäuren (Histidin (H), Aspartat (D) bzw. Glutamat (E), Histidin (H) (HxD/E...-H Motiv) und an drei Moleküle Wasser. Das 2-Oxoglutarat bindet zweizählig über die C1-Carboxylgruppe und die C2-Ketogruppe an das Fe(II) und ersetzt somit zwei Wassermoleküle. Dabei bildet sich eine fast planare

fünfgliedrige Ringverbindung, in der das Fe(II) weiterhin in der 6-fach Koordination vorliegt und gegenüber Sauerstoff relativ reaktionsträge ist. Durch die Bindung des Substrates an das Enzym ändert sich die Fe(II)-Koordination von 6-fach zu 5-fach und richtet sich quadratisch – pyramidal aus. Dabei wird eine Position für die Bindung des Sauerstoffs an das Fe(II) frei, und durch den Elektronentransfer von Fe(II) auf den Sauerstoff bildet sich eine reaktive Superoxid/Peroxid Spezies. Anschließend kann die Superoxid/Peroxid Spezies die C2-Ketogruppe des 2-Oxoglutarates nucleophil angreifen, wobei ein zyklisches Peroxid als Zwischenprodukt entsteht, das aber zur Ferrylspezies und CO₂ zerfällt. Die Ferrylspezies kann entweder ein Wasserstoffatom des Substrates homolytisch abspalten und das Substrat in einen „Rebound“-Mechanismus hydroxylieren oder ein zweites Wasserstoffatom wird vom Substrat unter Bildung von Wasser abgespalten und in diesem Prozess desaturiert. Kinetische Untersuchungen hinsichtlich des Reaktionsablaufes ergaben, dass die Prolyl 4-Hydroxylase (P4H) und die Thymin 7-Hydroxylase (T7H) erst Fe(II) und dann 2-Oxoglutarat binden. Anschließend bindet der Sauerstoff, gefolgt vom Substrat. Bei Abwesenheit des Substrates wird das 2-Oxoglutarat decarboxyliert und führt zur oxidativen Schädigung des Proteins (Kivirikko and Myllyharju, 1998; Kivirikko and Pihlajaniemi, 1998). Die Zugabe von Ascorbat kann diese Proteininaktivierung verhindern. Die Freisetzung der Produkte aus dem aktiven Zentrum erfolgt in der Reihenfolge CO₂, Succinat und Produkt, jedoch kann die Freisetzung des Produktes auch vor der Succinatfreisetzung erfolgen (Prescott et al., 2000). Bei der DAOCS bindet, wie bei der P4H, erst der Sauerstoff und anschließend das Substrat. Aufgrund der überlappenden Bindungstaschen von 2-Oxoglutarat und Penicillin G können sie nicht gleichzeitig im aktiven Zentrum vorkommen (Valegard et al., 2004).

2.5.3 Biosynthese von Proanthocyanidinen (PA's)

Die PA's sind oligomere oder polymere Endprodukte des Flavonoidbiosyntheseweges und werden auch als kondensierte Gerbstoffe bezeichnet. Die PA's sind in der Natur weit verbreitet und kommen in Früchten, Blättern, Rinden und Samen vieler Pflanzen vor (Shen et al., 2006). PA's sind aus Flavan-3-olen aufgebaut, zu denen zum Beispiel das (+)-Cat und (-)-Epicat gehören, die beide C3'/C4'-Catecholstruktur im B-Ring besitzen, (**Abb. 15**). Diese können als Start- und Erweiterungseinheiten, aber auch als Terminationseinheiten fungieren (Dixon et al., 2005).

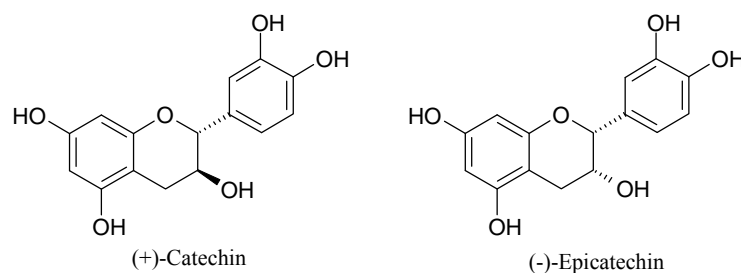


Abb. 15: Bildungseinheiten der PA's, Flavan-3-ole (Dixon et al., 2005)

Die Stereochemie von (-)-Epicat als 2,3 *cis*-Verbindung ist ungewöhnlich, weil alle Flavanole, wie auch das (+)-Cat, eine 2,3-*trans*-Konfiguration aufweisen (Foo & Porter, 1980). Ist der B-Ring nur am C4' hydroxyliert, handelt es sich um (+)-Afzelechin bzw. (-)-Epiafzelechin (C3', C4'), die dreifach hydroxylierten Verbindungen (C3', C4', C5') sind (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin (**Abb. 16**). Das Hydroxylierungsmuster im B-Ring wird auf einer früheren Stufe festgelegt und durch die F3'H und F3',5'H determiniert (**Abb. 11**).

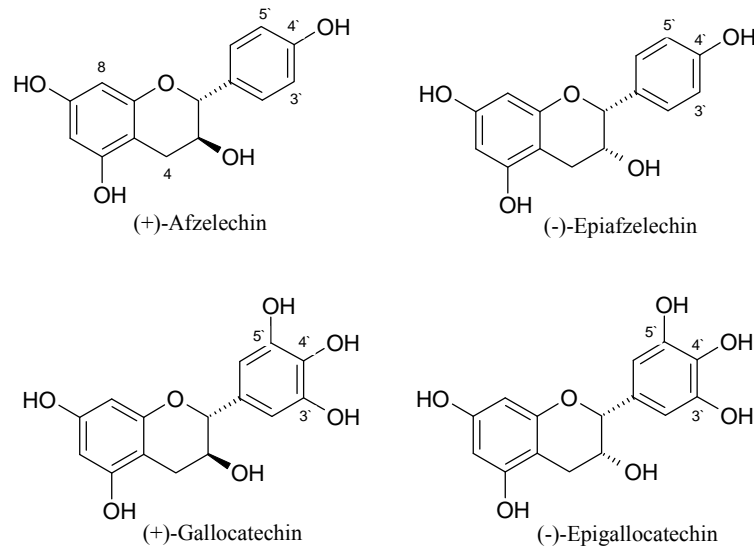


Abb. 16: Weitere Flavan-3-ole mit unterschiedlichen Hydroxylierungen am B-Ring

PA's können zum Beispiel durch die Kopplung der monomeren Flavan-3-ole von C4 der oberen Einheit („upper“) und dem C8 der unteren Einheit („lower“) entstehen (Bsp.: *Arabidopsis* Proanthocyanidin). Die Kopplung kann am C4 α - oder β -konfiguriert sein, was bisher noch nicht geklärt ist. Außerdem können PA's C4/C6 gekoppelt sein (Bsp.: Profistidinol) (Ferreira et al., 2003) oder, wie im Beispiel des Proanthocyanidins Typ A, erfolgt die Kopplung von C2 und C4 der oberen Einheit zum 7-Hydroxyl und C6 oder C8 der unteren Einheit (Bsp.: Erdnuss Procyanidin Dimer) (**Abb. 17**) möglich.

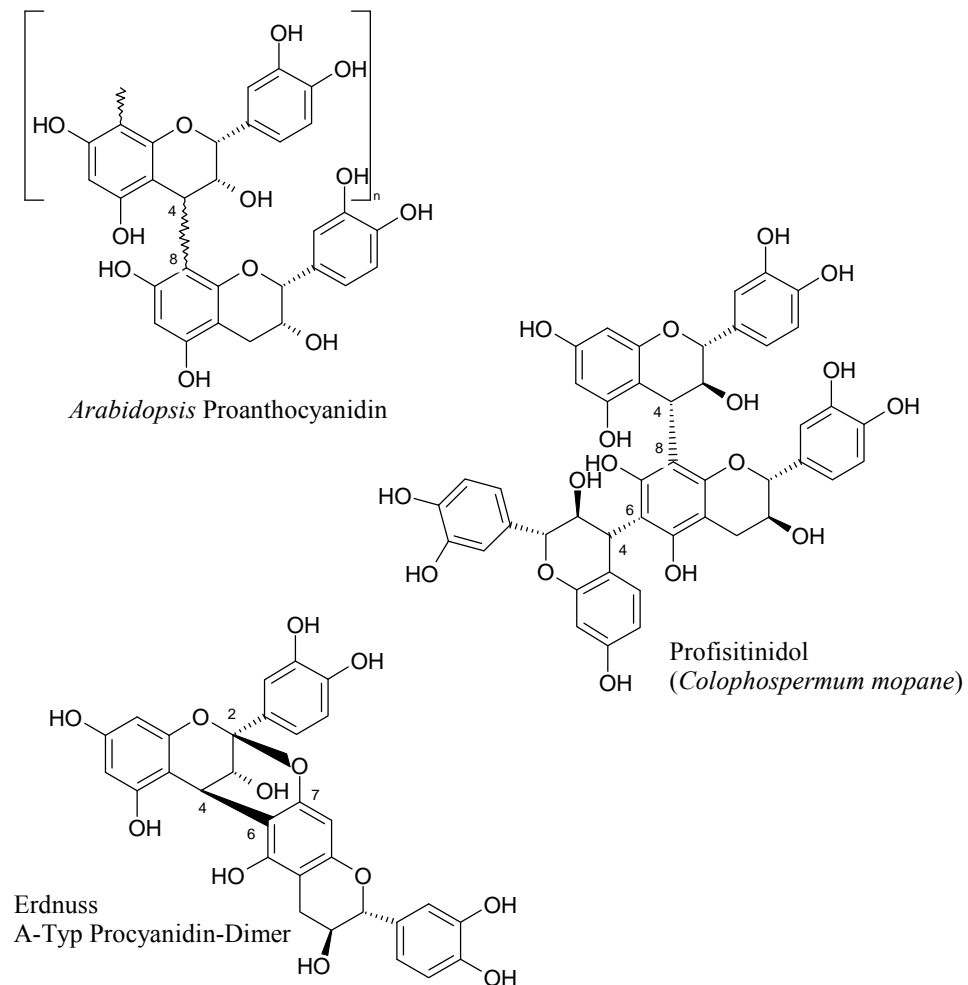


Abb. 17: Beispiele für die Kopplung von Flavan-3-olen; C4-C8 Kopplung im *Arabidopsis* Proanthocyanidin, C4-C6 Kopplung in Profisitidinol und C2-O7, C4-C6 Kopplung im Erdnuss Procyanidin Dimer (Dixon et al. 2005).

Die Verknüpfung der pflanzentypischen, unterschiedlichen Typen von Dimeren aus (+)-Cat und (-)-Epicat zu den Proanthocyanidinen des B-Typs (B₁-B₄) unterliegt einer enzymatischen Kontrolle. Zum Beispiel enthalten Wein, Hirse und Heidelbeeren das Proanthocyanidin B₁, das Proanthocyanidin B₂ kommt vor allem in Äpfeln, Kakaobohnen und Kirschen vor. In Erdbeeren, Hopfen und Weidenkätzchen wurde das Proanthocyanidin B₃ nachgewiesen. Das Proanthocyanidin B₄ ist in Himbeeren und Brombeeren enthalten (**Abb. 18**) (Haslam et al., 1977).

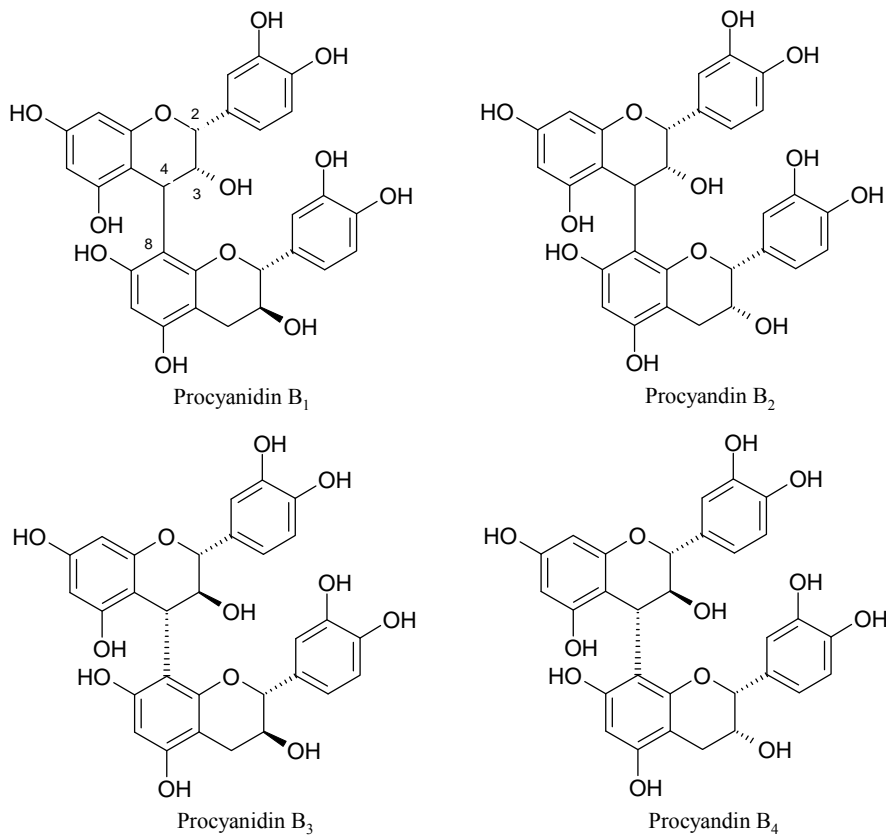


Abb. 18: Proanthocyanidine des B-Typs (Dixon et al., 2005).

Zusätzlich kann das C3-Hydroxyl von Flavan-3-olen mit Gallussäure verestert sein, wie im Proanthocyanidin aus Weintraubensamen (**Abb. 19**).

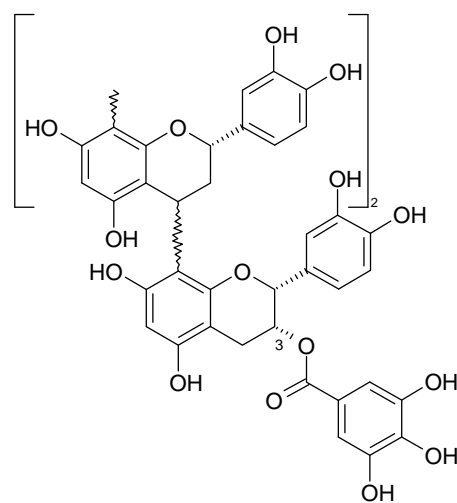


Abb. 19: Proanthocyanidin in Weintraubensamen (Dixon et al., 2005).

Die PA-Biosynthese wurde vor einigen Jahren untersucht. Allerdings stehen Leucoanthocyanidine als potentielle Substrate kommerziell nicht zur Verfügung, die Stereochemie der *cis*- und *trans*-Flavan-3-ole stellt ein Problem dar und instabile, leicht oxidierbare Produkte in den Pflanzenextrakten machen enzymatische Untersuchungen schwierig. Dennoch konnte gezeigt werden, dass zwei Enzyme für die Bildung von Flavan-3-olen erforderlich sind. Die Leucoanthocyanidinsynthase (LAR) und die Anthocyanidinreduktase (ANR). Die LAR setzt Leucoanthocyanidine (z. B. Leucopelargonidin, Lpg; Lcy) zu Flavan-3 β -olen mit 2,3-*trans*-Konfiguration um. Die ANR ist für die Umsetzung von den Anthocyanidinen (z. B. Pg; Cy usw.) zu Flavan-3 α -olen mit einer 2,3-*cis*-Konfiguration, verantwortlich. Die erste LAR-Aktivität wurde in den frühen 80igern von Stafford und Leester (1984) in Zellkulturen von *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) und *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) nachgewiesen, wobei Dihydroflavonole ((+)-DHM oder (+)-DHQ) zu Leucoanthocyanidinen und Catechin-Derivaten ((+)-Gallocatechin oder (+)-Cat) umgesetzt wurden (Stafford & Leester, 1984; 1985). Eine ähnliche Umsetzung von (+)-DHQ zu (+)-Cat konnte in Extrakten von Gerstenkörnern (*Hordeum secalinum*, Poaceae) nachgewiesen werden (Kristiansen et al. 1986). Diese Ergebnisse unterstreichen auch die Bedeutung der DFR für die PA-Biosynthese, die Leucoanthocyanidine als Substrate liefert (**Abb. 11**). Einige weitere Studien konnten diese Zwei-Schritt-Reaktion von DFR/LAR in Extrakten von PA-reichen Gemüsen (Tanner & Kristiansen, 1993), *Onobrychis viciifolia* (Fabaceae) (Singh et al., 1997), *Camellia sinensis* (Theaceae) (Punyasiri et al., 2004), *V. vinifera* (Pfeiffer et al., 2006; Gagné et al., 2009) und *M. domestica* (Pfeiffer et al., 2006) nachweisen. Außerdem konnte enzymatische LAR-Reaktion in *Rosa x hybrida* (Knott et al., 2004) und in *F. x ananassa* (Carbone et al., 2009) beobachtet werden. Das erste LAR Gen wurde aus *Desmodium uncinatum* (Fabaceae) kloniert (Tanner et al., 2003) und konnte der Isoflavonreduktase-ähnlichen Gruppe von pflanzlichen Genen der Reduktase-Epimerase-Dehydrogenase (RED) -Superfamilie zugeordnet werden. Weitere LAR cDNAs konnten inzwischen aus *V. vinifera* und *M. domestica* und anderen Pflanzen isoliert und charakterisiert werden (Pfeiffer et al., 2006). Die erste ANR-Aktivität wurde in einer Mutante von *Arabidopsis* nachgewiesen, in der die PA's fehlten und fast ausschließlich Anthocyane gebildet wurden. Die Anthocyanidine sind sehr instabil und werden entweder durch die FGT zu Anthocyanen umgesetzt, oder die ANR setzt diese Vorstufen zu Flavan-3 α -olen (z.B (-)-Epicat) um. Außerdem konnte die ANR-Aktivität in Extrakten von *D. uncinatum* und *Lotus corniculatus* (Fabaceae) Blättern, in Weintrauben und in Gerstenkörnern nachgewiesen werden (Xie and Dixon, 2005). Die ersten ANR cDNAs wurden aus *A. thaliana*

und *Medicago truncatula* (Fabaceae) isoliert und mittels Bakterienexpression biochemisch charakterisiert (Xie et al., 2004). Weitere putative ANR cDNAs konnten aus *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), *Gossypium arboreum* (Malvaceae) (Tanner et al., 2003), *G. hirsutum* L. (Xiao et al., 2007), *V. vinifera* (Tanner et al., 2003; Fujita et al., 2005), *M. domestica* (Pfeiffer et al., 2006) und *G. biloba* (Shen et al., 2006) isoliert werden.

2.5.4 Reaktionsweg zu den Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen

LAR und ANR, die zu Flavan-3-olen führen, gehören zu den NAD(P)^+ -Oxidoreduktasen und benötigen NADH oder NADPH als Cofaktor. *In vitro* Studien mit der ANR aus *M. truncatula* (MtANR) und *A. thaliana* (AtANR) zeigen, dass die MtANR NADPH oder NADH als Reduktionsmittel nutzen kann, aber NADPH bevorzugt. Die AtANR kann nur NADPH als Reduktionsmittel verwenden (Xie et al., 2004). Die Reaktionen, die von der ANR auf dem Weg zu 2,3-*cis*-Flavan 3-ole ((-)-Epicatechin) bzw. von LAR auf dem Weg zu 2,3-*trans*-Flavan-3-olen (z.B. (+)-Catechin) katalysiert werden, sind noch nicht vollständig aufgeklärt und deshalb sind die diesbezüglichen Vorschläge noch vorläufig. Ein möglicher Reaktionsmechanismus der ANR kann die Reduktion von Anthocyanidin (Flavyliumkation) zum Flav-3-en-3-ol oder Flav-2-en-3-ol sein (**Abb. 20**). Anthocyanidine weisen zwei Doppelbindungen im C-Ring auf und sind damit achiral. Die ANR reduziert die Anthocyanidine, NADPH-vermittelt, in zwei Schritten (zweimal zwei Elektronen) und ermöglicht im Vergleich zu (+)-Cat die entgegengesetzte Konfiguration an C3. Die chemische Synthese von Flavan-3-olen durch die Reduktion von Anthocyanidinen mit Platinoxid (PtO_2) in einer Wasserstoffatmosphäre oder mit Natriumborhydrid in Methanol oder Ethanol führt zu zwei Zwischenprodukten, den Flav-3-en-3-olen und Flav-2-en-3-olen. Beide Verbindungen sind an der Luft und in schwach saurer Lösung stabil und stehen mit der daraus resultierenden 3-Ketoform (Flavan-3-on Tautomer) im Gleichgewicht, welches weiter zu den Flavan-3-olen reduziert wird. Für den Ablauf der ANR Reaktion gibt es vier Möglichkeiten, die sich in zwei Kategorien unterteilen lassen. Dabei wird unterschieden, wo der nucleophile Angriff des Hydrid-Ions vom NADPH erfolgt, am C2 oder C4. Im ersten Fall erfolgt der nucleophile Angriff des NADPH Hydrid-Ions am C2 des Flavyliumkations und es entsteht das Flav-3-en-3-ol, wobei sich der Arylsubstituent am C2 von der β -Seite in 2*R*-Konfiguration orientiert. Nachfolgend greift $\text{NADPH} + \text{H}^+$ am C4 an und reduziert die C3/C4 Doppelbindung (**Abb. 20/1a**). Für die Konfiguration des C3-Hydroxyls ist entscheidend, von welcher Seite der Angriff des Hydrid-Ions erfolgt (α oder β -Form). Der Angriff an der β -Seite führt immer zu 2*R*,3*R*-2,3-*cis*-Flavan-3-olen. Alternativ kann das durch die ANR gebildete Flav-3-en-3-ol in das Zwischenprodukt Flavan-3-on (Tautomer) umgelagert werden, das durch weitere Reduktion mit $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zum Flavan-3-ol umgewandelt wird (**Abb. 20/1b**). Auch hier wird die 3*R*-Konfiguration C3-Hydroxyls durch den Angriff des Hydrid-Ions von der β -Seite bestimmt. Dieser Mechanismus wird unterstützt durch die *in vitro* Umsetzung von Flavan-3-on zu (+)-Cat und (-)-Epicatechin (Stafford et al., 1990), wobei das

Beiprodukt 2*R*,3*S*-Cat ((+)-Cat) durch den Angriff des Hydrids-Ions von der α -Seite entsteht. Im zweiten Fall erfolgt der nucleophile Angriff des Hydrids am C4, und es entsteht das achirale Flav-2-en-3-ol. Die Doppelbindung wird durch das NADPH reduziert und es bildet sich Flavan-3-ol, wobei die Konfiguration des Arylsubstituenten am C2 und des C3-Hydroxyls von der Seite des Hydrid-Angriffs abhängen muss (**Abb. 20/2a**). Alternativ wird das Flav-2-en-3-ol am C2 reduziert und es bildet sich das Tautomer Flavan 3-on. Dabei ist die Konfiguration der Arylgruppe am C2 mit der Hydrid-Addition an der α - und β -Seite verbunden. Die Ketogruppe am C3 wird wie im zweiten Mechanismus (**1a**) reduziert und es entsteht das Flavan 3-ol (Xie et al., 2004). Andere Reaktionsmöglichkeiten der ANR sind bis heute noch nicht bekannt.

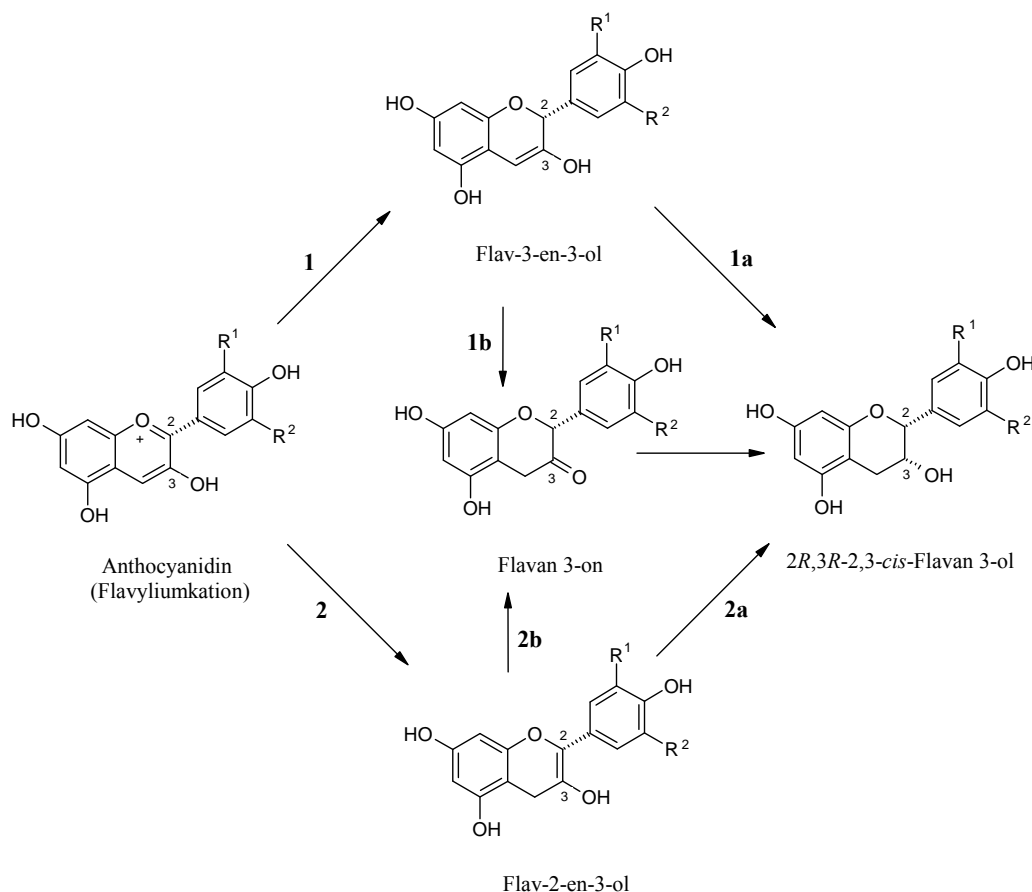


Abb. 20: Mögliche Reaktionswege der ANR zur Bildung von 2,3-cis-Flavan-3-olen aus Anthocyanidinen. R¹ und R² = H oder OH (Xie et al., 2004).

Der Mechanismen zur Bildung der PA's (Polymerisierung) sind noch vollständig ungeklärt. Es wird vermutet, dass Enzyme, wie Polyphenoloxidase (PPO) daran beteiligt sein könnten. Stafford zeigte 1988, dass die Polymerisierung zu PA's

und zu Lignin gewisse Ähnlichkeiten aufweisen (Stafford et al., 1988) und daher wird vermutet, dass bei der Biosynthese von den PA's auch Peroxidasen und Laccasen eine wichtige Rolle spielen könnten. Beweise für diese Vermutungen existieren allerdings nicht.

Die PA's werden nach Art der Kopplung von oberer und unterer Einheit in zwei Gruppen unterteilt (A- und B-Typ) (**Abb. 17, 18**). Es wird vermutet, dass das Chinon und das Karbokation von Leucoanthocyandinen als Vorstufen für die Erweiterungseinheiten der PA's genutzt werden können. Chemische Modell-Kondensationen von Cat oder Epicat mit Leucoanthocyanidin unterstützen diese Hypothese (Creasey & Swain, 1965), aber es erklärt weiterhin nicht, warum z. B. die dominierenden Erweiterungseinheiten der PA's in der 2*R*,3*R*-2,3-*cis*-Konfiguration ((-)-Epicat) vorliegen. Als potentielle Substrate für die Polymerisierung könnten auch Anthocyanidine in Betracht gezogen werden. Die Kondensation von Anthocyanidinen und Flavan-3-olen könnte demnach ein wichtiger Prozess für die Aromaausprägung in der Weinlagerung sein (Haslam et al., 1980).

Die Bildung der PA's vom B-Typ geht wahrscheinlich vom Karbokation des Leucoanthocyandins und den Flavan-3-olen aus (**Abb. 21/I**), die durch die LAR-Reaktion gebildet werden (**Abb. 21/Ia**). Unter sauren Bedingungen liegen die Anthocyanidine als Flavyliumkation (**Abb. 20**) vor und können durch eine PPO in ein Chinon und weiter in ein Karbokation umgewandelt werden (**Abb. 21/IIa**). Anschließend können Flavan-3-ole (z. B. Cat oder Epicat) das Karbokation nucleophil angreifen und es werden PA's gebildet (**Abb. 21/IIb**), wobei im Allgemeinen Cat vorwiegend als Startereinheit und Epicat als Erweiterungseinheit dienen. Von den Flavan-3-olen ((+)-Cat, (-)-Epicat) ausgehend, können diese Verbindungen durch eine PPO in Chinone umgesetzt werden (**Abb. 21/III**). Diese Chinone können entweder über Flav-3-en-3-ole in Karbokation (**Abb. 21/IIIa**) umgewandelt werden oder sie werden direkt zu Karbokationen durch eine nichtenzymatische Oxidation reduziert (**Abb. 21/IIIb**). Auch bei diesem Schritt können Cat oder Epicat nucleophil angreifen und Dimere oder oligomere PA's, mit einer Kopplung zwischen C4-C8 oder C4-C6, bilden (**Abb. 21/IIIc**) (Dixon et al., 2005). Diese Modell-Vorstellungen sind nur hypothetisch und müssen auch hinsichtlich ihrer chemischen Plausibilität überprüft werden. Das Flav-3-en-3-ol spielt auch eine Rolle bei der Bildung von 2*R*,3*R*-2,3-*cis*-Flavan 3-olen ((-)-Epicat) und stellt somit ein wichtiges Zwischenprodukt bei enzymatischer Umsetzung von Anthocyanidinen zu Flavan-3-olen, durch die ANR (**Abb. 20/1a**) und von Flavan-3-olen zu PA's dar.

Die PA's vom A-Typ (**Abb. 17**) unterscheiden sich durch die C2/C7 und C4/C8 oder C6 Kopplungen. Die Kondensation am C4 entspricht dem B-Typ und PA's vom A-Typ können *in*

vitro aus dem B-Typ gebildet werden. Zum Beispiel können die Proanthocyanidine B₁ oder B₂ in Anwesenheit eines geeigneten Oxidationsmittels (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Radikal) in Proanthocyanidin A₁ oder A₂ umgewandelt werden (Kondo et al., 2000).

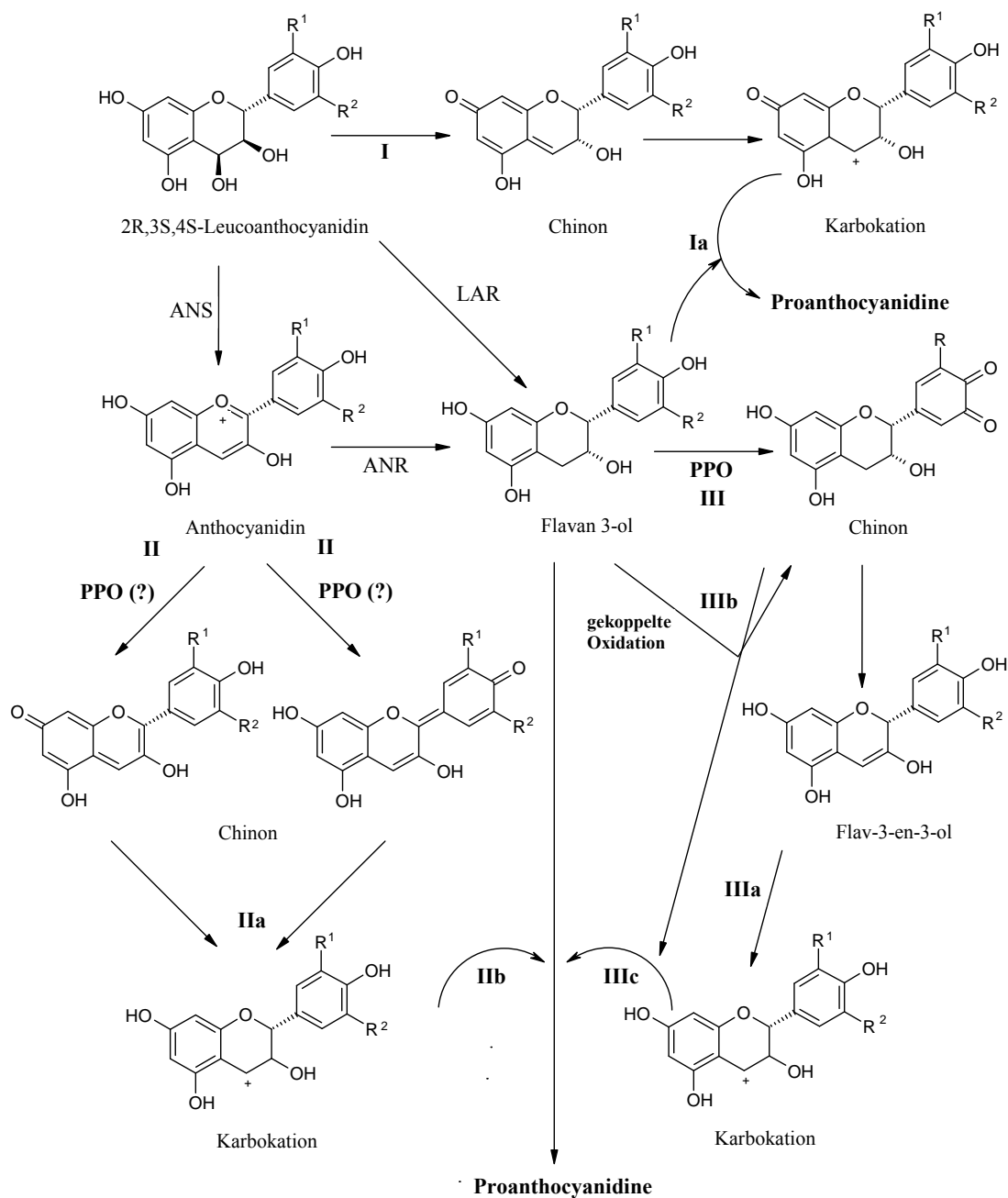


Abb. 21: Mögliche Reaktionsmechanismen für die Polymerisierung zu PA's. R¹ und R² = H oder OH (Dixon et al., 2005).

3 Aufgabenstellung

Obwohl die FLS aus *A. thaliana* bereits biochemisch untersucht wurde (Prescott et al., 2002; Owens et al., 2008) fehlen Kenntnisse zur Proteinstruktur. Außerdem enthält das *Arabidopsis* Genom sechs FLS-Isogene, und bis jetzt konnte nur für die FLS1 eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (Prescott et al., 2002; Owens et al., 2008). Zu den restlichen putativen Flavonolsynthasen (FLS2-6) lagen zu Beginn dieser Arbeit keine näheren biochemischen Erkenntnisse vor. Daraus ergab sich das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit: die Flavonolbiosynthese in *A. thaliana* sollte durch die biochemische Charakterisierung aller FLS-Sequenzen untersucht werden. Die Charakterisierung der rekombinanten FLS Polypeptide sollte unter dem Aspekt der Verwandtschaft mit anderen 2-ODD's, besonders der ANS (syn. LDOX), erfolgen.

Des Weiteren sollte die Flavonoidbiosynthese in den Früchten von *F. x ananassa* verfolgt und die Auswirkungen von Umwelteinflüssen, wie Wetterschwankungen, Sonnenscheindauer und Genotyp, untersucht werden. Darüber hinaus sollten die rekombinanten Flavonoidproteine aus *F. x ananassa* biochemisch charakterisiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Aminosäuren für SC-U Medium	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Amylose Resin	New England Biolabs, Frankfurt/Main
L(+)-Arabinose	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cyanidin	Extrasynthese, Genay, Frankreich
4-Coumaroyl-CoA	Sammlung des Institut
Desoxynukleotide	Fermentas, St. Leon-Rot
4-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dihydrokämpferol	Sammlung des Institut
Dihydromyricetin	Sammlung des Institut
Dihydroquercetin	Extrasynthese, Genay, Frankreich
Dihydorobonetin	Extrasynthese, Genay, Frankreich
Dihydrotamarexitin	Sammlung des Institut
Dowex 1x2-400 ion exchange resin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Eisen(II)-sulfat	Merck, Darmstadt
Eriodictyol	Extrasynthese, Genay, Frankreich
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
D-Galaktose	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glasbeads, unwashed, 425-600µm	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
D(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
HEPES Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Homoeriodictyol	Extrasynthese, Genay, Frankreich
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kämpferol	Roth, Karlsruhe
Kaffeoyl-CoA	Sammlung des Instituts
Leucocyanidin	Eigensynthese
Leucopelargonidin	Eigensynthese
D(+)-Maltose	Serva, Heidelberg
Micro Agar	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Naringenin	Roth, Karlsruhe
Natriumascorbat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Nitroblautetrazolium	Roth, Karlsruhe
2-Oxoglutarat	Roth, Karlsruhe
Pelargonidin	Extrasynthese, Genay, Frankreich
Pepton	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Polyethylenglykol 1500 (PEG 1500)	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon K30 (PVPP)	Roth, Karlsruhe
Profinity™ IMAC Ni Charged Resin	Bio-Rad, München
Quercetin	Roth, Karlsruhe
SeaKem® LE Agarose	Cambrex, Rockland, ME, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Seesand, geglüht	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Tris Pufferan	Roth, Karlsruhe
Yeast Nirtogen Base without amino acids	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
X-Gal	Fermentas, St. Leon-Rot

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Roth und Sigma in analysenreiner Qualität bezogen.

4.1.1 Radiochemikalien

Substanz	Spezifische Aktivität	Herkunft
[2- ¹⁴ C]-Malonyl-CoA	53 mCi/mmol	Moravek Biochemicals, Bea, USA
[¹⁴ C] Naringenin	0,095 µCi/nmol	eigene Synthese, siehe Kap. 4.10.1
[¹⁴ C] Eriodictyol	0,095 µCi/nmol	eigene Synthese, siehe Kap. 4.10.1
[¹⁴ C] Dihydrokämpferol	0,095 µCi/nmol	eigene Synthese, siehe Kap. 4.10.2
[¹⁴ C] Dihydroquercetin	0,095 µCi/nmol	eigene Synthese, siehe Kap. 4.10.2
[¹⁴ C] UDP-Glucose	50 µCi/mmol	Amersham, GE Healthcare, UK

4.1.2 Reagenzienansätze (Kits)

Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.3 Enzyme

<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.4 Antiseren und Proteine

Anti-Rabbit-IgG aus Ziege, gekoppelt an Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Antiserum aus Kaninchen gegen Flavonolsynthase (FLS)	Dr. F. Wellmann, 'nano Tools' Antikörpertechnik GmbH, Teningen
Rinderserumalbumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
SDS 7 Protein-Marker	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.5 Membranen

PVDF-Membran	Schleicher&Schuell, Dassel
--------------	----------------------------

4.1.6 Dünnschichtplatten und Laufmittel

Für die Dünnschichtchromatographie wurden die Celluloseplatten ohne Fluoreszenzindikator von der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

Laufmittel:	BAW (Butanol/Essigsäure/Wasser 6:1:2)
	CAW (Chloroform/Essigsäure/Wasser 10:9:1)
	30% Essigsäure
	Forestal (Essigsäure/Salzsäure/Wasser 30:3:10)

4.2 Pflanzenmaterial

Art	Sorte/Stamm/Linie	Herkunft
<i>A. thaliana</i> *	Columbia-0 (Wildtyp)	Universität Bielefeld
	<i>fls1-2m</i> (FLS1-Mutante)	Universität Bielefeld
	<i>ldox/fls1-2m</i> (Doppelmutante)	Universität Bielefeld
<i>F. x ananassa</i> **	Camarosa	Metaponto, Cesena (Italien)
	Candonga	Metaponto, Cesena (Italien)
	Onda	Cesena (Italien)
	Queen Elisa	Cesena (Italien)
	99:20:01	Metaponto, Cesena (Italien)
	99:163:14	Metaponto, Cesena (Italien)

*Bei diesem Pflanzenmaterial von *A. thaliana* handelt es sich um Keimlinge und adulte Pflanzen.

**Bei diesem Pflanzenmaterial von *F. x ananassa* handelt es sich um Früchte in unterschiedlichen Wachstumsstadien (G1, G2, W, T, R) (Carbone et al., 2009).

4.3 Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Genotyp	Literatur/Hersteller
TOP10	<i>F mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe www.invitrogen.com
BL21-AI™	<i>F ompt hsdS_B(r_B-m_B)gal dcm araB::T7 RNAP-tetA</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe www.invitrogen.com
K12 TB1	<i>F araΔ (lac-proAB)[ø80lacΔ(lacZ)M15] rspL (Str^R) thi hsdR = JM 83 hsdR</i>	New England Biolabs, Frankfurt/Main www.neb.com
Survival T1 ^R	<i>F mcr AΔ (mrr-hsdRMS-mcr BC) Φ 80 lac ZΔM15 Δ lac X74 rec A1 ara Δ139</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe www.invitrogen.com
INV Sc1	<i>MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT his3D1 Leu2 trp1-289 ura3-52</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe www.invitrogen.com

4.4 Vektoren

4.4.1 Vektoren für die Klonierung von PCR Produkten („full length“ Klone)

pYES2.1/V5-His-TOPO TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe),
siehe auch Kapitel **4.12.3**.

4.4.2 Vektoren für die Expression in *E. coli*

pDEST14	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pMal-c4x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main

4.4.3 Vektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

pYES2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pYES-DEST52	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

4.5 Puffer und Lösungen

4.5.1 Lösungen für die Hefetransformation

Lösung 1 1,0 M Sorbitol
 10 mM Bicine-NaOH (pH 8,35)
 3 % Ethylenglykol
 5 % DMSO

Lösung 2 40 % PEG1000
0,2 M Bicine-NaOH (pH 8,35)

Lösung 3 0,15 M NaCl
 10 mM Bicine-NaOH (pH 8,35)

4.5.2 Lösungen für die Bakterientransformation

Lösung 1 100 mM MgCl₂ in dest. Wasser

Lösung 2 100 mM CaCl₂ in dest. Wasser
 15 % Glycerol

4.5.3 Lösungen für die Isolierung von Plasmid DNA

GTE Puffer 50 mM Glucose
 25 mM Tris/HCl (pH 7,5)
 10 mM EDTA
 0,02 mg RNase/ml

Lysepuffer 0,2 M NaOH
 1 % SDS (w/v)

PAS 5 M Kaliumacetat (pH 4,8)

4.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngelpuffer 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer 0,5 M Tris/HCl pH 6,8

5 x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl pH 6,8 8 % (v/v) Glycerin 6 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
5 x Laufpuffer	0,25 M Tris/HCl pH 8,9 76 g/l Glycin 10 g/l SDS
Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in Wasser
Entfärberlösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure in Wasser

4.5.5 Western-Blot

TBS-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,1 150 mM NaCl
Anodenpuffer I	0,3 M Tris/HCl pH 10,4 10 % Methanol (v/v)
Anodenpuffer II	25 mM Tris/HCl pH 10,4 10 % Methanol (v/v)
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 9,4 10 % Methanol (v/v) 40 mM Aminohexansäure

Blockierungslösung	TBS-Puffer 5 % Milchpulver (w/v)
TBS-Tweenpuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,1 150 mM NaCl 0,5 % Tween 20 (v/v)
Farbreaktionspuffer	1 M Tris/HCl pH 8,8 1 mM MgCl ₂

4.5.6 Puffer für die Säulenchromatographie

Aufschlusspuffer 1	100 mM Tris/HCl pH 7,5
Aufschlusspuffer 2	100 mM KPi pH 6,5
Aufschlusspuffer 3	50 mM KPi pH 7,8 100 mM KCl 10 % Glycerol (v/v) 0,5 % Triton X-100 (v/v) 10 mM Imidazol
IMAC-Aufschluss/Binde/Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 5 mM Imidazol
IMAC-Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 500 mM Imidazol

pMal-Aufschluss/Binde/Waschpuffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT
pMal-Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 10 mM Maltose
SEC-Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 5 mM DTT
DEAE-Auftragspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 5 mM DTT
DEAE-Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 5 mM DTT 1 M NaCl

Die angegebene Menge an DTT wurde stets unmittelbar vor Verwendung hinzugefügt. Die Puffer wurden bei 4 °C gelagert.

4.6 Sonstige Puffer

TE-Puffer pH 8,0	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0
------------------	---

4.7 Medien

4.7.1 Bakterienmedien

LB-Medium(Luria Bertani)	10 g/l Pepton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
	1 ml 1 M MgSO ₄
	4 ml Glycerin (v/v)
	pH 7,5 mit 1 N NaOH einstellen.

LB-Agarplatten	LB-Medium
	1,5 % Select-Agar

pMal-Medium	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	2 g/l Glucose

SOC-Medium	20 g/l Pepton
	5 g/l Hefeextrakt
	0,5 g/l NaCl
	20 mM Glucose

4.7.2 Hefemedien

SC-U-Medium

6,7 g/l Yeast Nitrogen Base

je 0,1 g/l: Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin,
Tryptophan

je 0,05 g/l: Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin,
Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

20 g/l Glucose

SC-U-Agarplatten	SC-U Medium 2 % Select-Agar
YPGE-Medium	10 g/l Hefeextrakt 10 g/l Pepton 5 g/l Glucose 3 % Ethanol (v/v)
YPGA-Medium	10 g/l Hefeextrakt 10 g/l Pepton 20 g/l Glucose 0,2 g/l Adenin

4.8 Geräte

BAS FLA 2000 Bioimaging Analyzer	Fuji Photo Film, Tokyo, Japan
Software AIDA, Version 4.15	Raytest, Straubenhardt
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Fast Protein Liquid Chromatographie-Anlage	Pharmacia, Freiburg
High Performance Liquid Chromatographie-Anlage	Merck Hitachi, Darmstadt
PAGE-Apparatur: Mini-Protean 3 Cell	Biorad, München
Robocycler Gradient 96	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Sorvall® RC 5C Zentrifuge	DuPont, Newton, USA
Sorvall® RMC 14 Tischzentrifuge	DuPont, Newton, USA
2K15 Zentrifuge	Sigma, München
Spektralphotometer UV-1602	Shimadzu, Kyoto, Japan
Thermomixer 5336 und 5437	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät Sonifer	Dr. Hielscher, Teltow
Western Blot Apparatur Milliblot SDE	Millipore, Eschborn
Sammy (Semi-dry-Blot) Blot Apparatur	Schleicher&Schuell, Dassel

4.9 Nachweis von Flavonoiden im Pflanzengewebe

4.9.1 Extraktion von Flavonoiden

Für die Extraktion von Flavonoiden aus verschiedenen Pflanzengewebe wurde das Pflanzenmaterial im Verhältnis 1:40 mit Methanol versetzt und für einige Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde mit dem Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und der verbleibende Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen. Der so hergestellte Extrakt kann bei 4 °C längere Zeit gelagert werden.

4.9.2 Hydrolyse von Flavonoiden

Die meisten Flavonoide kommen in der Pflanzenzelle als Glykoside vor. Zur Identifizierung der jeweiligen Aglyka wurden die Zuckerreste durch saure Hydrolyse abgespalten. Zur Hydrolyse wurde der Extrakt mit gleichen Teilen 4 N HCl gemischt und 15 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Extraktion der Flavonoidaglyka, wobei die Anthocyanidine mit Isoamylalkohol und alle anderen Flavonoide mit Ethylacetat extrahiert wurden. Durch Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten wurden die Flavonoidaglyka in verschiedenen Laufmitteln aufgetrennt (4.1.6). Die Identifizierung der Flavonoide erfolgte durch Co-Chromatographie mit authentischen Standards und durch Betrachtung der DC-Platten unter UV-Licht (243 nm) oder durch Färbereaktionen. Für den Nachweis von Flavanonen wurde die trockene Dünnschichtplatte mit einer Lösung aus 100 mg Natriumborhydrid, 1 ml Wasser und 9 ml Isopropanol besprüht und anschließend mit rauchender Salzsäure bedampft, wobei die Rückseite der Dünnschichtplatte warm angeblasen wurde. Die Flavonole konnten durch Bedampfen der Dünnschichtplatte mit Ammoniak oder HCl sichtbar gemacht werden. Für den Nachweis der Dihydroflavonole wurde die Dünnschichtplatte mit Zink bepinselt und mit konz. Salzsäure besprüht (Pew et al., 1948). Die Anthocyanidine wurden durch ihre Färbung direkt auf der Dünnschichtplatte nachgewiesen.

4.10 Enzymologische Untersuchungen

4.10.1 Synthese von ^{14}C -markierten Naringenin und Eriodictyol

Die Herstellung von ^{14}C -NAR und ^{14}C -ERI erfolgte durch Umsetzung von 4-Cumaroyl-CoA (für ^{14}C -NAR) und Kaffeoyle-CoA (für ^{14}C -ERI) und $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Malonyl-CoA mit rekombinant hergestellter Chalkonsynthase (CHS, Herkunft *Pinus sylvestris*) und Chalkonisomerase (CHI, Herkunft *Petunia hybrida*) in einer abgewandelten Methode nach Britsch et al. (1981) und Britsch und Grisebach (1985).

Der Ansatz setzte sich zusammen aus:	120 μl	0,1 M KPi pH 6,5
	50 μl	CHS
	15 μl	CHI
	10 μl	$[^{14}\text{C}]$ -2-Malonyl-CoA (17,6 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$)
	5 μl	4-Cumaroyl-CoA bzw Kaffeoyle-CoA (1 nmol)

Die Ansätze wurden nach 60 min Inkubation bei 37 °C durch zweimalige Extraktion mit 150 μl Ethylacetat von den Edukten abgetrennt und die Produkte bzw. deren Reinheit mittels Co-Chromatographie mit authentischen Standards identifiziert. Die Auswertung der Dünnschichtchromatographie auf Cellulose erfolgte mit dem BSA FLA 2000 Bioimaging Analyzer.

4.10.2 Synthese von ^{14}C -markierten Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin

Für die Herstellung von den ^{14}C markierten Dihydroflavonolen wurden ^{14}C -NAR (für ^{14}C -DHK) und ^{14}C -ERI (für ^{14}C -DHQ) mit heterolog exprimierter Flavanon 3 β -hydroxylase (FHT, Herkunft *Anethum graveolens*, Gebhardt et al., 2005) umgesetzt.

Der Ansatz setzte sich zusammen aus:

120 µl	0,1 M KPi pH6,5
10 µl	0,72 mM FeSO ₄
10 µl	10 mM Na-Ascorbat
10 µl	9,1 mM 2-Oxoglutarat
50 µl	FHT
5000 dpm	¹⁴ C-NAR bzw. ¹⁴ C-ERI (0,095µCi/nmol)

Zuerst wurde das in Ethylacetat gelöste ¹⁴C-NAR bzw. ¹⁴C-ERI im Reaktionsgefäß unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt und anschließend die Inkubationslösungen zupipettiert. Die Ansätze wurden 30 min bei 30 °C in offenen Reaktionsgefäßen und unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Die Produkte wurden durch zweimaliges Ausschütteln mit Ethylacetat (150 µl) von den Edukten abgetrennt und ein Aliquot auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Platte) aus Cellulose aufgetragen. Die Identifizierung und Bestimmung der Reinheit erfolgte durch Co-Chromatographie mit authentischen Standards. Die Auswertung der DC-Platten wurde mit dem BSA FLA 2000 Bioimaging Analyzer durchgeführt.

4.10.3 Synthese von Leucopelargonidin und Leucocyanidin

Die Leucoanthocyanidine (Lpg, Lcy) werden chemisch mit Hilfe von Natriumborhydrid aus den entsprechenden Dihydroflavonolen synthetisiert.

5-10 mg Dihydroflavonole (DHK, DHQ) werden zusammen mit 2,5-5 mg Natriumborhydrid (NaBH₄) in 1 ml 100% Ethanol gelöst und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 5 ml 0,1% Essigsäure zu dem Ansatz dazugegeben und bei 40°C für 4 Stunden inkubiert. Danach wird der Syntheseansatz aliquotiert und bis zur Benutzung bei -80°C gelagert. Die Synthese von ¹⁴C-markierten Leucoanthocyanidinen (Lpg, Lcy) erfolgt analog, als Substrate werden jedoch ¹⁴C-markierte Dihydroflavonole (4.10.2) eingesetzt.

4.10.4 Proteinaufarbeitungsmethoden

Die Enzymextrakte aus dem Pflanzenmaterial wurden mit Methoden in Anlehnung an Diesperger et al. (1974) und Dellus et al. (1997). hergestellt. Daraus ergaben sich für die

Pflanzenmaterialien drei Aufarbeitungsmöglichkeiten. Alle Schritte wurden bei 4 °C und mit gekühlten Geräten durchgeführt.

(a) „Normale“ Aufarbeitung (Diesperger et al., 1974)

200 mg Pflanzenmaterial

100 mg Seesand, geglüht

400 mg Dowex 1x2-400 (equilibriert in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5)

1,5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 10 mM Na-Ascorbat und 28 mM 2-Mercaptoethanol

Das Pflanzenmaterial wurde mit Seesand, Dowex und Puffer im Mörser homogenisiert und anschließend für 5 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Enzymtests verwendet.

(b) „Dellus“ Aufarbeitung (Dellus et al., 1997)

30 ml 0,1 M HEPES pH 7,5

450 mg PEG 1500

3,0 g Saccharose

400 mg Na-Ascorbat

8,4 mg CaCl₂

300 µl 1 mM DTT

500 mg Pflanzenmaterial

500 mg PVPP

800 mg Dowex 1x2-400 (equilibriert in
0,1 M HEPES pH 7,5)

Zunächst wurde der Puffer 0,1 M HEPES pH 7,5 bis zum Sieden erhitzt und anschließend unter Stickstoffzufuhr auf Eis abgekühlt. Währenddessen wurden unter ständigem Rühren die restlichen Bestandteile zugegeben.

Dann wurden 500 mg Pflanzenmaterial mit 500 mg PVPP unter Zugabe von flüssigem Stickstoff fein gemörkert und 4 ml vom frisch hergestellten Puffer zugegeben. Nach vollständigem Auftauen des Gemisches auf Eis wurde 10 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde danach mit 800 mg Dowex 1x2-400 (equilibriert in 0,1 M HEPES pH 7,5) versetzt, kurz mit Stickstoff belüftet und für 10 min auf Eis rühren gelassen. Anschließend wurde 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C

zentrifugiert, der Überstand (Proteinrohextrakt) wurde abgenommen und für die Enzymtests verwendet.

(c) Mikrosomenpräparation mit Mg^{2+} (Diesperger et al., 1974)

1,0 g Pflanzenmaterial

1,0 g Dowex 1x2-400 (equilibriert in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5)

0,5 g Seesand, gegläht

8 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 10 mM Na-Ascorbat und 28 mM 2-Mercaptoethanol

Das Pflanzenmaterial wurde mit Seesand, Dowex und Puffer im Mörser homogenisiert und anschließend für 20 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurde 1 ml abgenommen und als Kontrolle für Enzymtests verwendet. Die restlichen 7 ml Überstand wurden mit 140 µl 1 M $MgCl_2$ -Lösung versetzt (Endkonzentration von 30 mM Mg^{2+}) und 10 min auf Eis rühren gelassen. Danach wurden 20 min bei 16.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurde nochmals 1 ml als weitere Kontrolle für Enzymtests abgenommen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Puffer aufgenommen, im Potter homogenisiert und für weitere Enzymtests verwendet.

4.10.5 Standardenzymtests

Die Enzymtests wurden mit ^{14}C -markierten Substraten und mit unmarkierten („kalten“) Substraten durchgeführt. Die radioaktiv markierten Substrate befanden sich in Ethylacetat gelöst, und die „kalten“ Substrate wurden als Stammlösung von 1 mg/ml in Methanol, Puffer oder Wasser verwendet. Direkt vor dem Enzymtest wurden die Lösungsmittel (Ethylacetat, Methanol) unter vermindertem Druck entfernt. Im Standardtest wurden Pflanzenextrakt (50 µg Protein) oder Extrakte aus entsprechend transformierter Hefe bzw. *E. coli* (100 µg Protein) eingesetzt und für 60 min bei 30 °C inkubiert. Der Enzymtest wurde durch Zugabe von 200 µl Ethylacetat gestoppt und die Flavonoide extrahiert. Eine zweite Extraktion erfolgte mit 50 µl Ethylacetat. Nach dem Zentrifugieren wurden die Oberphasen zur Untersuchung auf eine DC-Platte aus Cellulose aufgetragen.

(a) CHS-Test

90 µl	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
100 µl	Enzymrohextrakt (50 µg Gesamtprotein bzw. 100 µg rekombinantes Protein)
5 µl	[2- ¹⁴ C]-Malonyl-CoA (8,8 µCi/mmol)
5 µl	4-Cumaroyl-CoA (1 nmol) bzw. Kaffeoyl-CoA

Das Gesamtvolumen betrug 200 µl pro Ansatz, und die Inkubation erfolgte im geschlossenen Reaktionsgefäß.

(b) FHT-Test

70 µl	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
100 µl	Enzymrohextrakt (wie für CHS beschrieben)
10 µl	0,72 mM FeSO ₄
10 µl	10 mM Na-Ascorbat
10 µl	9,1 mM 2-Oxoglutarat
Substrate:	5000 dpm ¹⁴ C-NAR oder ¹⁴ C-ERI (0,095 µCi/nmol)

Das Gesamtvolumen betrug 200 µl pro Ansatz, und die Inkubation erfolgte im offenen Reaktionsgefäß.

(c) DFR-Test

90 µl	0,1 M KPi pH 6,5
100 µl	Enzymrohextrakt (wie für CHS beschrieben)
10 µl	20 mM NADPH
Substrate:	5000 dpm ¹⁴ C-DHK oder ¹⁴ C-DHQ (0,095 µCi/nmol)

Das Gesamtvolumen betrug 200 µl pro Ansatz, und die Inkubation erfolgte im geschlossenen Reaktionsgefäß.

(d) FLS-Test

70 µl	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
100 µl	Enzymrohextrakt (wie für CHS beschrieben)
10 µl	0,72 mM FeSO ₄
10 µl	10 mM Na-Ascorbat
10 µl	9,1 mM 2-Oxoglutarat
Substrate:	5000 dpm ¹⁴ C-DHK oder ¹⁴ C-DHQ (0,095 µCi/nmol)

Das Gesamtvolumen betrug 200 µl pro Ansatz, und die Inkubation erfolgte im offenen Reaktionsgefäß.

(e) ANS-Test

Für den ANS Enzymtest wurde eine gekoppelte 2-Schritt-Reaktion durchgeführt, in dem ersten Schritt wurden mit Hilfe der DFR Leucoanthocyanidine hergestellt und im darauf folgenden Schritt die Anthocyanidine gebildet.

110 µl	0,1 M KPi pH 6,5
50 µl	rekombinante DFR aus <i>Callistephus chinensis</i> (100 µg Protein)
10 µl	20 mM NADPH
Substrate:	5000 dpm ¹⁴ C-DHK oder ¹⁴ C-DHQ (0,095 µCi/nmol)

Die Inkubation erfolgte im geschlossenen Reaktionsgefäß, und nach 30 min wurden folgende Bestandteile zugegeben:

100 µl	Enzymrohextrakt (Gesamtprotein bzw. rekombinante ANS)
10 µl	0,72 mM FeSO ₄
10 µl	10 mM Na-Ascorbat
10 µl	9,1 mM 2-Oxoglutarat

Das Gesamtvolumen betrug 300 µl pro Ansatz. Die Inkubation erfolgte im offenen Reaktionsgefäß, und nach 30 min wurden die Flavonoide mit Ethylacetat extrahiert.

(f) F3'H-Test

90 µl	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
100 µl	Enzymrohextrakt (wie für CHS beschrieben)
10 µl	20 mM NADPH
Substrate:	5000 dpm ^{14}C -NAR, ^{14}C -DHK oder ^{14}C -Lpg (0,095 µCi/nmol)

Das Gesamtvolumen betrug 200 µl pro Ansatz, und die Inkubation erfolgte im geschlossenen Reaktionsgefäß.

(g) LAR-Test

130 µl	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
100 µl	Enzymrohextrakt (wie für CHS beschrieben)
20 µl	20 mM NADPH
Substrate:	50 µl Lpg oder Lcy

Das Gesamtvolumen betrug 300 µl pro Ansatz, und die Inkubation erfolgte im geschlossenen Reaktionsgefäß.

(h) ANR-Test

100 µl	0,1 M KPi pH 5,5
100 µl	Enzymrohextrakt (wie für CHS beschrieben)
50 µl	20 mM NADPH
Substrate:	50 µl Pg oder Cy gelöst in 0,1 M KPi pH 5,5 (1mg/ml)

Das Gesamtvolumen betrug 300 µl pro Ansatz, und die Inkubation erfolgte im geschlossenen Reaktionsgefäß.

(i) FGT-Test

45 µl	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
100 µl	Gesamtprotein aus Enzymrohextrakt
5 µl	UDP-[U- ¹⁴ C]-Glucose (76.4 pmol)
Substrate:	50 µl Pg oder Cy gelöst in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 (1mg/ml)

Das Gesamtvolumen betrug 200 µl pro Ansatz, und die Inkubation erfolgte im geschlossenen Reaktionsgefäß.

4.10.5 HPLC-Analyse**(a) Trennung von Leucoanthocyanidinen und *trans*-Flavan-3-olen**

Die Trennung von Leucoanthocyanidine (Lpg, Lcy) und *trans*-Flavan-3-olen ((+)-Cat, (+)-Afzelechin) erfolgte auf einer HPLC (HP 1090 Liquid Chromatograph, Böblingen). Die Flavonoidextrakte der Enzymtests wurden unter verminderten Druck zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in 150 µl 10 % Acetonitril aufgenommen. Als stationäre Phase diente eine Nucleodur Sphinx C18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Kieselgel; Machery & Nagel), und als mobile Phase wurde ein Wasser/Acetonitril-Gradient verwendet, wobei sowohl das Wasser als auch das Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure versetzt wurden. Die Auftrennung der Flavonoide mit der HPLC-Analyse erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min und einem Injektionsvolumen von 75 µl. Die Leucoanthocyanidine und *trans*-Flavan-3-ole wurden durch Absorption bei 280 nm nachgewiesen. Die HPLC-Methode setzte sich wie folgt zusammen:

	Wasser (0,1 % Ameisensäure)	Acetonitril (0,1 % Ameisensäure)
0,0 min	90 %	10 %
20,0 min	77 %	23 %
21,0 min	10 %	90 %
26,0 min	10 %	90 %
28,0 min	90 %	10 %
31,0 min	90 %	10 %

4.11 Proteinbiochemische Methoden

4.11.1 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurde nach Bradford et al. (1976) durchgeführt. Als Standard diente das Rinderserum-Albumin, Fraktion V.

4.11.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli et al. (1970) als „slab“-Gelelektrophorese durchgeführt.

(a) Herstellung eines 12,5 % Trenngels

4,1 ml	30 % wässrige Acrylamid-Lösung
2,5 ml	Trenngelpuffer (4.5.4)
400 µl	10 % SDS-Lösung
3,0 ml	Wasser
16 µl	TEMED
70 µl	10 % Ammoniumpersulfat

(b) Herstellung eines 5 % Sammelgels

375 µl	30 % wässrige Acrylamid-Lösung
625 µl	Sammelgelpuffer (4.5.4)
100 µl	10 % SDS-Lösung
1,4 ml	Wasser
5 µl	TEMED
70 µl	10 % Ammoniumpersulfat

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE denaturiert, indem 10 µl Proteinlösung (10 µg Protein) mit 5 µl DTT-Lösung (16 mg/ml) und 5 µl SDS-Probenpuffer (4.5.4) versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanten 200 V im Laufpuffersystem (4.5.4) für ca. eine Stunde. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue (4.5.4) gefärbt, und nach ca. 20 min wurde der überschüssige Farbstoff mit Entfärberlösung (4.5.4) entfernt.

Zu stark verdünnte Proteinlösungen (< 1 µg /µl) wurden vor der Elektrophorese mit einem Teil 24 % Trichloressigsäure versetzt und für 30 min auf Eis gefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Niederschlag zweimal mit 500 µl eiskaltem Aceton (-20 °C) gewaschen, getrocknet, in 10 µl DTT-Lösung (8 mg/ml) wieder aufgenommen und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

4.11.3 Westernblot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) unter Anlegen einer Spannung (nach Angaben des Herstellers) auf eine PVDF-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen (Towbin et al., 1979).

Die Durchführung des Western-Blots erfolgte mit geringen Abwandlungen nach den Angaben des Herstellers:

Die PVDF-Membran (9 x 6 cm) wurde zuvor in Methanol aktiviert, mit dest. Wasser gewaschen, mit Anodenpuffer II (4.5.5) äquilibriert und für den Proteintransfer mit Filterpapier (9 x 6 cm) unterlegt. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (4.5.5) versetzt. Anschließend wurde eine 1:2000 Verdünnung des polyklonalen Antiserums gegen *Citrus unshiu* FLS (Lukačín et al.,

2001), gelöst in Blockierungslösung, zu der PVDF-Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-Tweenpuffer (4.5.5) und dreimal mit TBS-Puffer (4.5.5) gewaschen. Nachfolgend wurde die PVDF-Membran mit einer 1:4000 Verdünnung des polyklonalen Anti-Rabbit-IgG-Serums aus Ziege, gekoppelt an Alkalische Phosphatase, in Blockierungslösung versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten Waschen mit TBS-Tweenpuffer wurde die Membran mit Farbreaktionspuffer (4.5.5) äquilibriert und mit 100 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) (50 mg/ml DMF) und 300 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) (75 mg/ml 70 % DMF), gelöst in 20 ml Farbreaktionspuffer, angefärbt. Die Farbreaktion wurde mit dest. Wasser abgestoppt.

4.12 Molekularbiologische Untersuchungen

4.12.1 Standard-PCR

Mit Hilfe der PCR wurden DNA-Abschnitte aus Plasmiden amplifiziert. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µl:

5,0 µl	10x <i>Taq</i> -Polymerasepuffer
3,0 µl	MgCl ₂ (0,5 mM)
1,0 µl	dNTPs (0,2 mM)
1,5 µl	je Primer (0,2 µM)
1,0 µl	Plasmid-DNA
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U)
36,5 µl	Wasser

Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet : 5,0 min Denaturierung bei 95 °C, 40 Zyklen á 1,0 min Denaturierung bei 95 °C, 1,0 min Annealing bei 60 °C und 2,0 min Elongation bei 72 °C. Anschließend folgte eine weitere Elongationsphase von 10,0 min bei 72 °C. Die Schmelztemperatur (Annealing) wurde durch die Länge und die Sequenz der verwendeten Primer bestimmt.

4.12.2 Synthese von Oligonucleotiden (Primern)

Die Oligonucleotide (Primer) für die PCR wurden durch die Firma Eurofins MWG GmbH (Martinsried) hergestellt.

4.12.3 Enzymkatalysierte Reaktionen

(a) Ligation

Die Ligation der Restriktionsfragmente in die entsprechenden Vektoren erfolgte mit der T4-DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) in einem molaren Verhältnis von 3:1 oder 6:1 bei 22 °C für 15 Stunden.

(b) TOPO Cloning

Die Ligation von PCR-Produkten in den pYES 2.1 TOPO Vektor wurde durch Topoisomerase-Reaktion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der entsprechende Vektor (Plasmid) liegt in einer ringoffenen Form vor, und die 3'-Enden sind kovalent mit Topoisomerase I aus *Vaccinia* Virus verbunden. Verfügt das PCR-Produkt über einen 5' A-Überhang, kann dieser sich an den 5' T-Überhang des Plasmidstrangs (Vektor) anlagern. Dadurch kann das PCR-Produkt die Bindung zwischen dem 3'- Ende des Plasmids (Vektor) und die Topoisomerase mit der 5'- Hydroxylgruppe angreifen und in den Vektor eingebaut werden (**Abb. 22**).

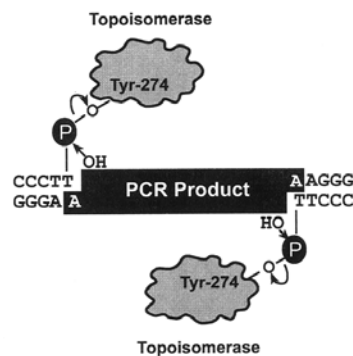


Abb. 22: Einbau eines PCR-Produktes mit Hilfe des TOPO TA Cloning (aus dem pYES2.1 TOPO® TA Cloning Manual, Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

(c) Gateway LR Clonase Reaktion

Die Gateway Technologie stellt einen alternativen Weg zur klassischen Klonierung von DNA Sequenzen dar. Diese universale Klonierungsmethode macht sich die Eigenschaften der Erkennungssequenzen vom Bakteriophagen Lambda zu eigen und ermöglicht eine schnelle Umklonierung von DNA Sequenzen in zahlreiche andere Vektorsysteme (**Abb. 23**).

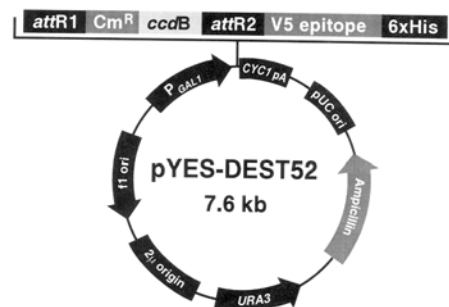
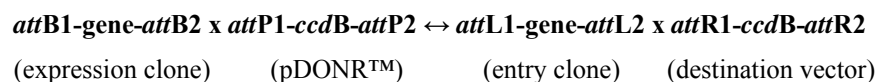


Abb. 23: Einbau einer DNA Sequenz in einen Destination Vektor mit Hilfe der Gateway Technologie (aus dem pYES-DEST52Gateway® Vector Manual, Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

(d) Restriktionsverdau

Restriktionsverdaus von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen nach den Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot) angesetzt und in der Regel bei 37°C durchgeführt.

4.12.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 250 ml LB-Medium (4.7.1) mit 2,5 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600}=0,4$ bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5.000 rpm, 4 °C), in 50 ml eiskalter 100 mM $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 5.000 rpm, 4 °C) wurden die Bakterien in 5 ml

eiskalter 100 mM CaCl_2 /15 % Glycerol-Lösung aufgenommen, in vorgekühlte Eppendorfgefäße (150 μl) aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Die Transformation der Bakterien erfolgte nach dem Auftauen auf Eis durch Zugabe von 1 μl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA, 30 min Inkubation auf Eis, 30 sec Hitzeschock bei 42°C und 60 min in 250 μl SOC-Medium (4.7.1) bei 37°C und 220 rpm, zur Regeneration. 150 μl eines Ansatzes wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.12.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

(a) Alkalische Lyse Miniprep

Die Isolierung der Plasmid-DNA für den Restriktionsverdau und für die Transformation in Hefen oder Bakterien wurde nach der Vorschrift aus Current Protocols (Engbrecht et al., 2001) durch Alkalische Lyse durchgeführt. Die Einzelkolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 μl GTE-Puffer (4.5.3) resuspendiert. Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 200 μl Lysepuffer (4.5.3) und 5 min Inkubation auf Eis. Durch die Zugabe von 150 μl PAS (4.5.3) und 5 min Inkubation auf Eis wurde das SDS ausgefällt. Anschließend wurde 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit 1 ml eiskalten Ethanol p.a. versetzt. Danach wurde erneut zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm), das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die getrocknete Plasmid-DNA (Pellet) wurde anschließend in 50 μl Wasser gelöst.

(b) Isolierung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung

Die Plasmid-DNA für die Sequenzierung wurde mit Hilfe des Kits NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert.

4.12.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von isolierter Plasmid-DNA wurde durch die Firma Eurofins MWG GmbH (Martinsried) durchgeführt. Sequenzanalysen und Datenbankvergleiche wurden über die NCBI Homepage (BLAST X) und durch ClustalW erstellt.

4.12.7 Expression der At_FLS1, 2, 3, 5 und At_ANS in *E. coli* BL21-A1-Zellen

Die FLS und ANS Konstrukte aus *A. thaliana* wurden mit der Gateway Technologie in pDEST14 einkloniert. Nach der Transformation von kompetenten *E. coli* BL21-A1-Zellen mit den At_FLS1, 2, 3, 5 und At_ANS pDEST14-Konstrukten (4.7.1), wurde jeweils eine Kolonie gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Amp Medium (4.7.1) bei 37 °C und 220 rpm angezogen. Für die Expression der einzelnen Proteine wurde 100 ml frisches LB-Amp Medium mit einer 1/100 Verdünnung der Übernachtskultur angeimpft ($OD_{600} = 0,05-0,1$) und unter Schütteln (220 rpm) bei 37 °C inkubiert bis eine OD_{600} von 0,4 erreicht wurde. Die Induktion erfolgte durch Zugabe einer 20 %igen Arabinose-Lösung (Endkonzentration 0,2 %). Nach einer weiteren Inkubation über 4 Stunden bei 37 °C und 220 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm, 4 °C) geerntet und in 5 ml Aufschlusspuffer 3 (4.5.6) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch 30 sec Ultraschall (Sonifier; Cycle 0,6; Amplitude 100 %) auf Eis. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (10 min, 16.000 rpm, 4 °C), um die Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde als Proteinrohextrakt aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70 °C eingefroren bzw. zur Aufreinigung verwendet. Die erfolgreiche Expression wurde durch SDS-PAGE der Proteinrohextrakte verfolgt (siehe 4.11.2) und die katalytische Aktivität mittels Enzymtest überprüft (siehe 4.10.4).

4.12.8 Expression von At_ANS in *E. coli* K12 TB1-Zellen

Die Transformation von *E. coli* K12 TB1-Zellen mit dem At_ANS pMal c4x Konstrukt wurde auf LB-Amp-Platten ausplattiert und die Expression erfolgte in 250 ml pMal-Amp Medium (4.7.1). Es wurde eine Kolonie gepickt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm angezogen. Für die Expression des Proteins wurde 250 ml frisches pMal-Amp Medium mit 1/100 Verdünnung der Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln (220 rpm) bei 37 °C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Die Induktion erfolgte mit 1 M IPTG (Endkonzentration 0,3 M) über 3 Stunden bei 37 °C und 220 rpm. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm, 4 °C) geerntet und in 5 ml pMal-Aufschlusspuffer (4.5.6) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch 4 Minuten Ultraschall (Sonifier; Cycle 0,6; Amplitude 100 %) auf Eis. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (20 min, 9.000 rpm, 4 °C), um die Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde als Proteinrohextrakt für die Reinigung über eine Amylose-Resin Säule verwendet. Die Expression wurde durch SDS-PAGE der Proteinrohextrakte verfolgt.

4.12.9 Transformation kompetenter *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

Die Herstellung von kompetenten Hefenzellen (INV Sc1, Hefestamm) erfolgte nach Angaben des Herstellers (S. c. EasyComp™ Transformation Kit, Invitrogen). 10 ml YPGA-Medium (4.7.2) wurde mit einer frischen Übernachtskultur (Vorkultur, INV Sc1 mit YPGA-Medium über Nacht bei 30 °C, 170 rpm) angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,6 – 1,0 bei 30 °C und 170 rpm inkubiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5 min, 5.000 rpm), in 10 ml Lösung 1 (4.5.1) resuspendiert und erneut abzentrifugiert (5 min, 5.000 rpm). Das Pellet wurde in 1 ml Lösung 2 (4.5.1) aufgenommen, in vorgekühlte Eppendorfgefäße (100 µl) aliquotiert und bei –70 °C eingefroren.

Die Transformation von Hefezellen erfolgte mit 50 µl kompetenten INV Sc1-Zellen, 1 µg Plasmid-DNA und 500 µl Lösung 3 (4.5.1). Die Transformationsreaktion wurde 1 Stunde bei 30 °C inkubiert, und alle 15 Minuten wurde kurz gevortext. Anschließend wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf SC-U-Platten (4.7.2) ausgestrichen und 2 – 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.12.10 Expression von At_FLS1, 2, 3, 5 und At_ANS in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Expression und die Isolierung der rekombinanten Proteine wurde in abgewandelter Form nach Pompon et al. (1996) durchgeführt.

Die FLS und ANS Konstrukte aus *A. thaliana* wurden mit der Gateway Technologie in den pYES-DEST52 einligiert. Nach Transformation von kompetenten *INVSc1*-Zellen mit den At_FLS1, 2, 3, 5 und At_ANS pYES-DEST52-Konstrukten, wurden jeweils ca. 10 Kolonien in 50 ml SC-U-Medium (4.7.2) angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 170 rpm angezogen (Vorkultur). Für die Hauptkultur wurden 250 ml YPGE-Medium (4.7.2) mit frischer Vorkultur versetzt bis eine OD₆₀₀ von 0,2 – 0,4 erreicht war. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,2 bei 30 °C und 170 rpm inkubiert und mit 27 ml 20 %iger Galaktose-Lösung induziert. 15 Stunden nach der Induktion wurden die Hefezellen für die Isolierung der Proteine geerntet (Aufschluss lösliche Proteine). Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4.000 rpm, 4 °C) gesammelt und in 27 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert für die FLS-Isoenzyme bzw. in 27 ml 0,1 M KPi pH 6,5 für die ANS. Danach wurde erneut zentrifugiert (5 min, 4.000 rpm, 4 °C), das Pellet wurde in 2,5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 bzw. 0,1 M KPi pH 6,5 aufgenommen und in ein Falcon mit 7,5 g Glasperlen gefüllt. Durch 30 sec kräftiges vertikales Schütteln und 30 sec Inkubation auf Eis (für insgesamt 20 Minuten) wurden die Hefezellen aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Hefezellen wurden nochmals mit 5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 bzw. 0,1 M KPi pH 6,5 gewaschen und die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (10 min, 16.000 rpm, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde als Proteinrohextrakt mit 10 % Glycerin gemischt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei –70 °C eingefroren.

Die Isolierung des At_ANS Protein aus Hefezellen wurde mit dem IMAC-Aufschlusspuffer (4.5.6) durchgeführt.

4.13 Reinigung der heterolog exprimierten At_FLS1, 2, 3, 5 und At_ANS aus *Arabidopsis thaliana*

4.13.1 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die Rohextrakte aus den At_FLS1, 2, 3 und 5 Transformanten (4.12.7) wurden mit Ammoniumsulfat (30 – 80%) gefällt. Dazu wurde unter Rühren auf Eis die entsprechende Menge an pulverisiertem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ langsam hinzugegeben und nach 30 % Sättigung zentrifugiert (10 min, 16.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde bis 80 % mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gesättigt und erneut zentrifugiert (10 min, 16.000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml SEC-Elutionspuffer (4.5.6) resuspendiert und durch Größenausschlusschromatographie gereinigt.

4.13.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

(a) Material

Fractogel EMD Bio SEC (Merck, Darmstadt), ist ein makroporöses partikuläres Polymethylacrylat (Partikelgröße 20 – 40 µm, Porengröße 500 – 800 Å), das durch Umsetzung mit Diethylenglykol hydrophilisiert wurde und dessen Oberfläche mit aufgepfropften Linerpolymeren aus Methoxyethylacrylamid belegt ist.

(b) Säule

Superperformance (600 x 16 mm, Gelbettvolumen von 119 ml).

(c) Durchführung

Die Säule wurde mit ca. 3 Säulenvolumen SEC-Elutionspuffer (4.5.6) bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Die Fraktion aus der Ammoniumsulfatfällung (30 – 80 %) wurde über eine 1 ml Probenschleife direkt auf die Säule gegeben und mit dem SEC-Elutionspuffer eluiert (Flussrate 1 ml/min). Die Elution von Proteinen wurde durch einen UV-Detektor bei 280 nm verfolgt, die Fraktionen auf Aktivität getestet und durch

SDS-Page bzw. Western-Blot überprüft. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und für weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

4.13.3 Anionenaustauschchromatographie (DEAE)

(a) Material

Fractogel DEAE 650 (S) (Merck, Darmstadt), ist ein basischer Ionenaustauscher (Partikelgrösse 20 – 40 μm), dessen funktionelle Diethylaminoethylgruppen einen pK-Wert > 11 besitzen.

(b) Säule

Superperformance SF (156 x 26 mm, Gelbettvolumen von 67,5 ml).

(c) Durchführung

Die Säule wurde mit ca. 3 Säulenvolumen DEAE-Auftragspuffer **(4.5.6)** bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Die vereinigten, enzymatisch aktiven Fraktionen der SEC **(4.13.2)** wurden über den Superloop auf die Säule gegeben und durch anschließendes Waschen mit dem DEAE-Auftragspuffer (1 ml/min) ungebundenes Protein entfernt. Nach Erreichen der Basisextinktion wurden die gebundenen Proteine in einem linearen Salzgradient (0 – 1 M NaCl) bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Dazu wurde dem DEAE-Auftragspuffer fortlaufend DEAE-Elutionspuffer **(4.5.6)** zugesetzt, bis der Anteil vom DEAE-Elutionspuffer 100 % erreichte. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Aktivität getestet und durch SDS-PAGE bzw. Western-Blot überprüft.

4.13.4 Reinigung über His-Tag Säule (Immobilized metal affinity chromatographie, IMAC)

(a) Material

Profinity IMAC Resin (Bio-Rad, München) mit einer Partikelgrösse von 45 – 90 μm wurde verwendet. Das Nickel-Affinitätsmaterial besteht aus einer UNOsphere Matrix mit daran gebundener Iminoessigsäure (IDA) als funktionellem Liganden. IDA kann Ni^{2+} und andere Übergangsmetallionen unter Chelatbildung fixieren und dadurch können Fusionsproteine über ihren His-Tag selektiv an die Ni^{2+} - Ionen der Säule binden. Die Bindekapazität für die His-Tag Proteine beträgt $\geq 15 \mu\text{g/ml}$ Säulenmaterial.

(b) Säule

Eine leere und saubere PD-10 Säule wurde mit 2 ml Profinity IMAC Resin gefüllt und mit IMAC-Bindepuffer (4.5.6) equilibriert.

(c) Durchführung

Für die Reinigung aus dem Heferohextrakt wurde das Batch-Verfahren verwendet, das sich besonders gut bei geringem Expressionslevel eignet. Der Proteinrohextrakt aus dem Hefezellenaufschluss (4.12.10) von je 250 ml Hauptkultur wurde auf das Säulenmaterial gegeben und 30 Minuten unter Schwenken bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Durchlauf (ungebundenes Protein) aufgefangen und das gebundene Protein mit 5 ml IMAC-Waschpuffer (4.5.6) gewaschen. Dann wurde mit 1 x 500 μl (1. Elution) und mit 1 x 3 ml IMAC-Elutionspuffer (2. Elution) (4.5.6) eluiert. Die 2. Elution wurde über eine PD-10 Säule nach Angaben des Herstellers in 0,1 M KPi pH 6,5 umgepuffert, mit 10 % Glycerin versetzt und bei –70 °C eingefroren.

4.13.5 Reinigung mit Amylose Resin (pMal™ Protein Fusion and Purification System)

(a) Material

Amylose Resin

(b) Säule

Eine leere und saubere PD-10 Säule wurde mit 1 ml Amylose Resin gefüllt und mit pMal-Bindepuffer (4.5.6) äquilibriert.

(c) Durchführung

Die Methode wird angewendet zur Reinigung von Fusionsproteinen, die eine Maltose-Bindungsstelle (MBP, maltosebindingprotein) enthalten (**Abb. 24**).

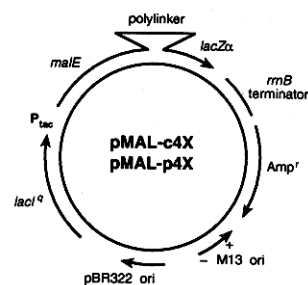


Abb. 24: Einbau einer DNA Sequenz in den pMal c4x Vektor für die Bildung eines MBP Fusion Proteins (aus dem pMal™ Protein Fusion and Purification System Manual, New England Biolabs, Frankfurt am Main).

Das *malE* Gen von *E. coli* kodiert das MBP und führt zur Expression eines MBP Fusionsproteins. Das in Vektor pMal c4x kodierte MBP verfügt über eine bessere Bindekapazität für Amylose. Diese Methode nutzt den „tac“ Promoter und die *malE* Translationsinitiationssignale für einen höheren Expressionlevel der klonierten DNA Sequenz und ermöglicht eine „one step“ Reinigung des Fusionsproteins aufgrund der MBP-Affinität zu Maltose. Der Proteinrohextrakt aus 4.12.8 wurde auf das Säulenmaterial gegeben und ein paar Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Durchlauf (ungebundenes Protein) aufgefangen und die Säule mit 5 ml pMal-Waschpuffer (4.5.6) gewaschen. Danach wurde mit 2 x 1 ml (1. und 2. Elution) und mit

1 x 3 ml pMal-Elutionspuffer (3. Elution) (4.5.6) eluiert. Anschließend wurde die 3. Elution mit Hilfe von Centriprep auf 1 mg/ml aufkonzentriert, um das MBP vom Fusionprotein abspalten zu können. Die Abspaltung erfolgte mit dem Protease Factor Xa in einem Zeitraum von 2 - 24 Stunden auf Eis.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Voruntersuchungen von *Arabidopsis thaliana*

5.1.1 Pflanzenmaterial

Enzymologische und biochemische Untersuchungen der Flavonoidbiosynthese, besonders die der Flavonole, wurden mehrfach an unterschiedlichen Pflanzengeweiben von *A. thaliana* durchgeführt (Pelletier et al., 1997; Pelletier et al., 1999; Veit et al., 1999; Peer et al., 2001; Broun et al., 2005; Routaboul et al., 2006). Für diese Untersuchungen wurden Keimlinge und adulte Pflanzen vom Wildtyp Columbia-0 (*Col-0*) und der FLS1-Mutante (*fls1-2m*), sowie von Keimlingen der ANS/FLS1-Doppelmutante *ldox/fls1-2m* verwendet. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial von *A. thaliana* wurde freundlicher Weise von Herrn Dr. Ralf Stracke, Universität Bielefeld (AG Bernd Weisshaar), zur Verfügung gestellt.

5.1.2 Nachweis von Flavonolen

Keimlinge von *Arabidopsis Col-0*, *fls1-2m* und *ldox/fls1-2m* wurden extrahiert und die Extrakte sauer hydrolysiert. Die Auftrennung der Hydrolysate mittels Dünnschichtchromatographie zeigte sowohl im Wildtyp *Col-0* als auch in den Mutanten *fls1-2m* und *ldox/fls1-2m* die Anwesenheit von Flavonolen. Im Wildtyp *Col-0* und in beiden Mutanten (*fls1-2m*, *ldox/fls1-2m*) wurden Qu und Km eindeutig identifiziert, obwohl die Mutanten quantitativ viel weniger dieser Flavonole aufwiesen. (**Abb. 25**). Darüber hinaus wurde Km auch in Form des Trisaccharid durch LC-PDA-QTOF-MS quantifiziert (**Abb. 26**) (Stracke et al., 2009). Die Ergebnisse der *fls1-2m* Mutante sind überraschend, weil Flavonole bei Verlust der CHS vollständig fehlen, und lassen darauf schließen, dass ein anderes Enzym die FLS1 komplementieren kann. Es ist wahrscheinlich, dass eine Isoform (At_FLS2-6) der FLS-Familie oder die ANS an der Flavonolbiosynthese beteiligt sein könnte. *In vitro* Studien der rekombinanten ANS aus *A. thaliana* (Welford et al., 2001; Prescott et al., 2002; Wilmouth et al., 2002; Turnbull et al., 2004) und aus *Perilla frutescens* (Saito et al., 1999) hatten gezeigt, dass die ANS in der Lage ist, neben ihrer eigentlichen Reaktion, Dihydroflavonole und Flavanone zu Flavonolen umzusetzen. Die geringen Mengen an Qu in Extrakten der *ldox/fls1-2m* Mutante zeigen aber, dass neben FLS1 und ANS noch ein anderes Enzym für die Bildung von Qu verantwortlich sein muss. In *A. thaliana* existiert eine

FLS-Multigen-Familie von sechs Sequenzen mit relativ hoher Ähnlichkeit zueinander und zu anderen FLS-Sequenzen. Bis jetzt konnte jedoch nur der At_FLS1 eine enzymatische Aktivität zugewiesen werden. Die restlichen fünf putativen Flavonolsynthasen (At_FLS2-6) scheinen nicht funktionell zu sein (Prescott et al., 2002; Owens et al., 2008).

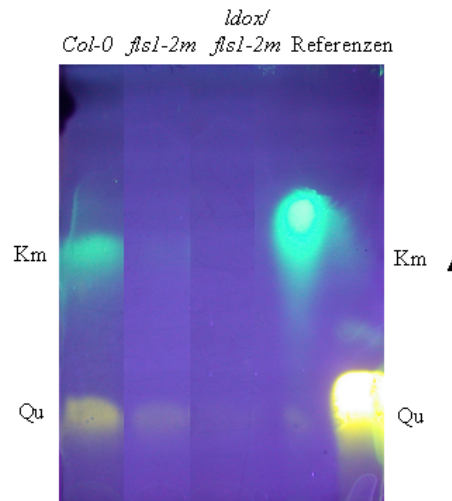


Abb. 25: Nachweis von Flavonolen in Extrakten aus *Arabidopsis* Keimlingen des Wildtypes (*Col-0*) und der Mutanten (*fls1-2m* und *ldox/fls1-2m*) nach saurer Hydrolyse. Die Chromatographie erfolgte auf Cellulose-Dünnschichtplatten in CAW. Km: Kämpferol, Qu: Quercetin.

Stracke et al. (2009) untersuchten die Flavonolakkumulation in den Mutanten *fls1-2m* und *ldox/fls1-2m* mit Hilfe der HPTLC. Als Kontrollen wurden der Wildtyp *Col-0* und die CHS (*tt4*)-Mutante, wo die Flavonoide fehlen, verwendet (Stracke et al., 2009). Im Wildtyp konnten sowohl Km- als Qu-Glykoside nachgewiesen werden. Bei der *fls1-2m* Mutante konnte eine Reduzierung der Km-, Qu- und Isorhamnetin-Glykoside beobachtet werden (Stracke et al., 2009). Dagegen stiegen die Konzentrationen der Dihydroflavonolglykoside an. Die Dihydroflavonole sind die essentiellen Substrate für die Anthocyan- und PA-Bildung durch DFR. In der *ldox/fls1-2m* Mutante konnte eine klare Reduzierung der Dihydroflavonol- und Flavonolglykosiden im Vergleich zur *fls1-2m* Mutante nachgewiesen werden. Allerdings sind die Mengen an Flavonolen in der *ldox/fls1-2m* Mutante signifikant im Vergleich zur CHS (*tt4*) Mutante, wo keine Flavonoide mehr nachgewiesen werden konnten (Owens et al., 2008; Stracke et al., 2009). Damit wird es sehr wahrscheinlich, dass die ANS in der Pflanze die FLS-Reaktion übernehmen kann (Stracke et al., 2009). Die Flavonole in der *ldox/fls1-2m* Doppelmutante könnten auf eine putative FLS (Isoform) hinweisen mit anderer Substratspezifität und geringerer Affinität zu den Dihydroflavonolen. Eine solche putative FLS könnte eine abweichende Gewebespezifität aufweisen, was die

unterschiedliche Akkumulation von Km und Qu in *Arabidopsis* in verschiedenen Geweben erklären würde (Owens et al., 2008; Lillo et al., 2008). Zum Beispiel konnte in der *En*-induzierten Mutante von *A. thaliana* (Wisman et al., 1998) gezeigt werden, dass Qu nicht mehr gebildet wird ohne die Km-Synthese zu beeinflussen. Das lässt darauf schließen, dass noch eine weitere FLS-Isoform aktiv sein kann (Owens et al., 2008).

Beim Anfärben der Keimlinge von *Col-0*, *fls1-2m* und *ldox/fls1-2m* Mutante mit DPBA (Diphenylborsäure-2-aminoethylester) konnten gleiche Ergebnisse wie bei der Extraktion beobachtet werden, in der eine klare Reduktion der Flavonolglykosidakkumulation in der *fls1-2m* und *ldox/fls1-2m* Mutante sichtbar wurde (Stracke et al., 2009). Außerdem konnte in der *fls1-2m* Mutante eine Zunahme der Anthocyanbildung beobachtet werden, was wiederum durch die erhöhte Expression der *DFR* und *ANS* Gene erklärt werden kann. Dagegen fehlen die Anthocyane in der *ldox/fls1-2m* Mutante (Stracke et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Antisenseexpression der *P. hybrida* FLS cDNA in *Petunia* und Tabak (Holton et al., 1993). Dabei wurde die Flavonolbildung in den Petalen reduziert, aber die Anthocyanbildung hochreguliert, wodurch sich die Petalen intensiv rot färbten.

Auch in der *fls1*-Mutante (Knock-out Mutante) durch T-DNA konnten noch geringe Mengen an Km und Qu nachgewiesen werden, wobei in den *fls3* und *fls5* keine Flavonole beobachtet wurden (Owens et al., 2008).

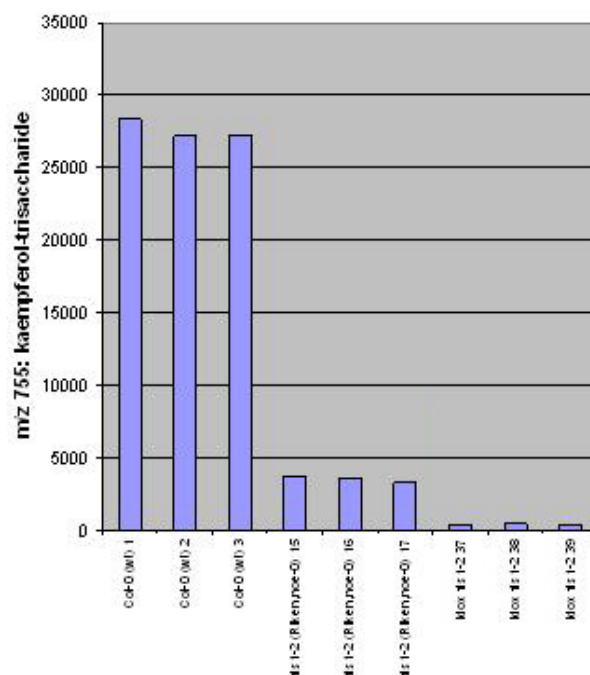


Abb. 26: Nachweis des Flavonols Kämpferol-Trisaccharid mittels LC-PDA-QTOF-MS, in *A. thaliana* Wildtyp (*Col-0*), FLS1-Mutante (*fls1-2m*) und ANS/FLS1-Doppelmutante (*ldox/fls1-2m*).

Untersuchungen von *En*-induzierten *A. thaliana* *tt6*-Mutanten (FHT-Knock-out Mutante) zeigten gelbe Samen (Wisman et al., 1998). Denn durch *tt6* kodierten FHT-Polypeptid fehlen 109 Aminosäuren einschließlich der Eisenbindungstelle mit dem hochkonservierten Histidin in Position 275. Zum Beispiel zeigte die FHT aus *Petunia hybrida*, bei der die Aminosäure ²⁷⁵His substituiert wurde, keine Aktivität mehr (Lukačín et al., 1997). Die Erklärung der gelben Pigmentierung in den Samen der Knock-out Mutante könnten die FLS1 und ANS liefern. *In vitro* Tests zeigten, dass FLS1 und ANS die FHT-Reaktion übernehmen können (Welford et al., 2001; Prescott et al., 2002; Turnbull et al., 2004; Owens et al., 2008; Preuss et al., 2009). In den Keimlingen von *tt6* konnten geringe Spuren an Flavonolen und Anthocyanen beobachtet werden (Owens et al., 2008). Eine weitere Möglichkeit bietet sich durch die F3'H und der Flavanon 4-Reduktase (FNR) Aktivität der DFR (Owens et al., 2008). Das bedeutet, dass NAR durch die F3'H zum Eriodictyol (ERI) (Schoenbohm et al., 2000) und weiter durch DFR zu den 3-Deoxyflavonoiden umgesetzt wird (Leonard et al., 2004). Diese Verbindungen konnten bereits in Mais (Grotewohl et al., 1994), Gerste (Snyder et al., 1990) und *Sinningia cardinalis* (Winefield et al., 2005) nachgewiesen werden.

Tab. 2: Flavonole in *Arabidopsis* Wildtyp und Mutanten. +: nachweisbar; (+): nur in Spuren nachweisbar; -: nicht nachweisbar. a: Stracke et al., 2008; b: Wisman et al., 1998

<i>Arabidopsis</i>	Kämpferol	Quercetin
Wildtyp (<i>Col-0</i>)	+	+
FLS1-Mutante (<i>fls1-2m</i>)	+	+
ANS/FLS1-Doppelmutante (<i>ldox/fls1-2m</i>)	(+)	(+)
CHS-Mutante (<i>chs/tt4</i>) ^a	-	-
FHT-Mutante (<i>fht/tt6</i>) ^b	+	+

5.1.3 Nachweis der FLS- bzw. ANS-Aktivität in Rohextrakten von Keimlingen und adulten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Rohe Enzymextrakte wurden mit der „normalen“ Aufarbeitungsmethode (Kap. 4.10.3) aus Keimlingen und adulten *Arabidopsis* Pflanzen des Wildtyps *Col-0* sowie der Mutanten *fls1-2m* und der *ldox/fls1-2m* hergestellt und Enzymtests mit ^{14}C -markiertem NAR, DHK oder DHQ als Substraten in Gegenwart von Ascorbat, Fe^{2+} und 2-Oxoglutarat durchgeführt. NAR kann durch die FHT zu DHK und von FLS- bzw. ANS-Aktivität weiter zum Km, DHK und DHQ durch FLS oder ANS direkt zum Km bzw. Qu umgesetzt werden. Der *Arabidopsis* Wildtyp *Col-0* besitzt sowohl in den Keimlingen als auch in den adulten Pflanzen FHT- und FLS-Aktivität (**Abb. 27**). Demnach könnte NAR durch FHT/FLS und DHK durch FLS zu Km umgesetzt werden. In *fls1-2m* und *ldox/fls1-2m* Mutanten, in der die FLS1 oder FLS1/ANS fehlen, konnte in den Keimlingen und adulten Pflanzen keine FLS- bzw. ANS-Aktivitäten wohl aber FHT-Aktivität nachgewiesen werden. Verantwortlich für die Bildung von Flavonolen in der *fls1-2m* Mutante könnte die ANS sein (Owens et al., 2008; Preuss et al., 2009). Eine ANS-Aktivität konnte jedoch bislang noch nicht in den Pflanzenextrakten nachgewiesen werden, was vermutlich auf ihre Instabilität zurückzuführen ist. Durch die Zugabe von Eisen, welches für 2-ODD's essentiell ist, könnte die ANS außerhalb der Pflanze stabilisiert werden (Owens et al., 2008). In Enzymextrakt der *ldox/fls1-2m* Mutante konnte weder FLS- noch ANS-Aktivität mit DHK und DHQ als Substrate nachgewiesen werden, obwohl der Extrakt geringe Spuren an Km und Qu aufweist. Bei dieser Mutante könnte eine der 5 putativen FLS (Isoformen) für die geringe Bildung an Qu und Km verantwortlich sein, wie unter 5.1.2 beschrieben.

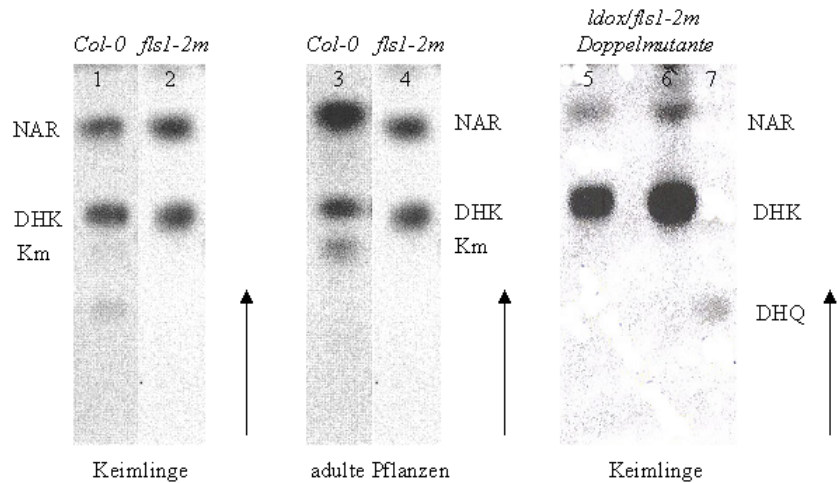


Abb. 27: Nachweis von FHT- bzw. FLS-Aktivitäten in Rohextrakten von *Arabidopsis* Wildtyp (*Col-0*), der Mutanten (*fls1-2m* und *ldox/fls1-2m*). Die Inkubationen wurden mit ^{14}C -markierten Substraten NAR (Spur 1, 3, 5), DHK (Spur 2, 4, 6) oder DHQ (Spur 7) durchgeführt und die Auswertung erfolgte nach Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittel CAW mit Hilfe des Bioimager.

5.1.4 Mögliche Wege zu Flavonolen in *Arabidopsis thaliana*

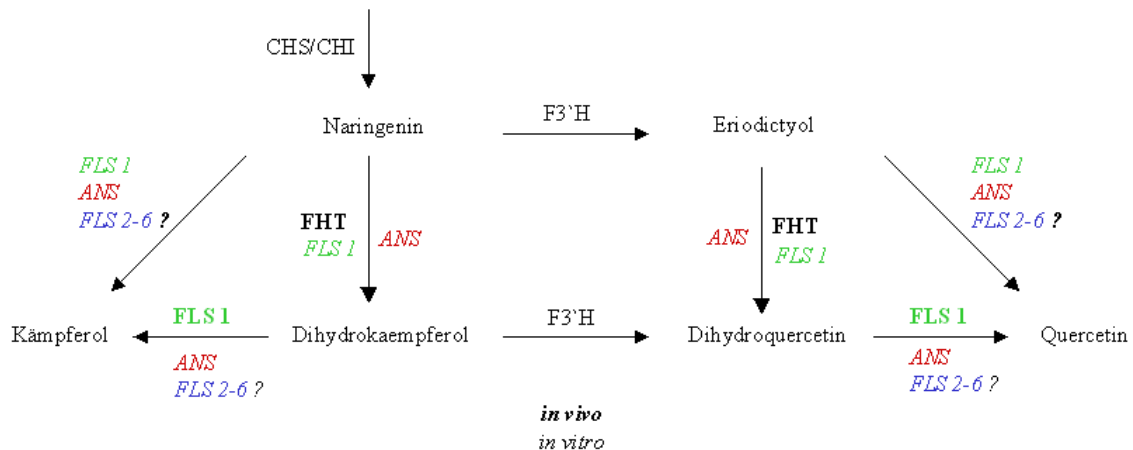


Abb. 28: Schematische Darstellung der Möglichkeiten zur Bildung von Flavonolen aus Naringeninchalkon in *A. thaliana*. Die Beteiligung der Enzyme FHT, FLS und ANS an den jeweiligen Umsetzungen ergibt sich aus den Untersuchungen von Pflanzen des Wildtyps (*Col-0*) und der Mutanten (*fls1-2m*, *ldox/fls1-2m*).

5.2 Klonierung der FLS und ANS aus *A. thaliana*

Als Ausgangsmaterial für die Expression in Hefe und Bakterien dienten FLS und ANS cDNAs aus *A. thaliana*, die über eine cDNA Bank aus den adulten Pflanzen des Wildtyps *Col-0* isoliert wurden. So standen letztendlich At_FLS1, fünf putative Flavonolsynthasen (At_FLS2, 3, 4, 5 und 6) und At_ANS zur Verfügung, wobei At_FLS4 und At_FLS6 vermutlich Pseudogene darstellen (Owens et al., 2008; Stracke et al., 2009) und deshalb in die weiteren Untersuchungen nicht einbezogen wurden. Im Kapitel 5.5 wird darauf näher eingegangen. Die DNAs der At_FLS1, der putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3, 5 und der At_ANS wurden freundlicher Weise von Dr. Ralf Stracke (Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt.

5.2.1 Expression der At_FLS1, der putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3, 5 und der At_ANS in Hefen

Die FLS- und ANS-Konstrukte wurden in den pDONR201 Vektor einligiert, wodurch mit Hilfe der Gateway Technologie die einzelnen DNA-Fragmente in den Hefevektor pYES-DEST52 umkloniert werden konnten. Durch die Transformation der FLS- bzw. ANS-pYES-DEST52-Konstrukte in INV *Sc1*-Zellen (Hefestamm) wurde deren funktionelle Expression (4.12.10) möglich. Nach dem Aufschluss der mit Galaktose (20%ige Lösung) induzierten Hefezellen wurden die resultierenden Rohextrakte auf FLS- bzw. ANS-Aktivität überprüft.

5.2.2 Nachweis der FLS- bzw. ANS-Aktivität in Hefetransformanten

Die enzymatische Aktivität der verschiedenen Extrakte wurde mit Hilfe eines Standardenzymtests überprüft, der ¹⁴C-markiertes DHK oder DHQ als Substrat, sowie Inkubationszeiten bis 60 min nutzt und die nachfolgende Auftrennung der Produkte Km und Qu durch Chromatographie auf Cellulose-Dünnschichtplatten CAW und 30% Essigsäure im Vergleich mit authentischen Standards umfasst. Damit konnte gezeigt werden, dass nur die At_FLS1 und die At_ANS Aktivität aufweisen, wohingegen die putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3 und 5 unter diesen Testbedingungen keine Aktivitäten entwickelten (**Abb. 29**) (**Tab. 3**).

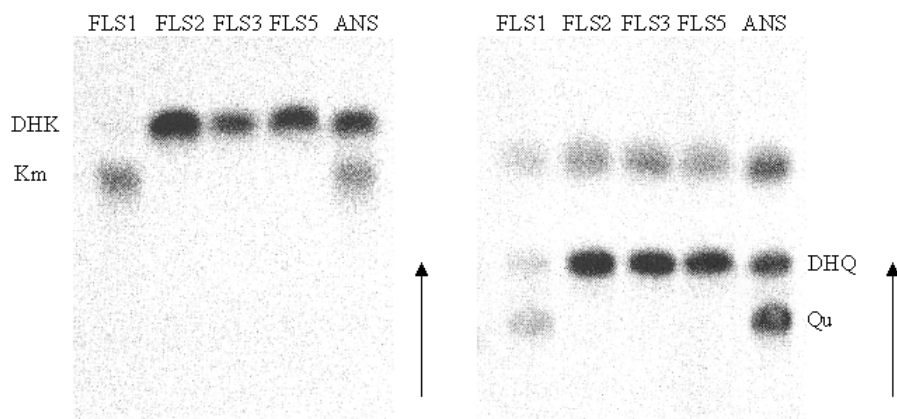


Abb. 29: Nachweis von FLS-Aktivität in Hefetransformanten At_FLS1, At_FLS2, 3, 5 oder At_ANS. Substrat und Produkte wurden nach Inkubation mit EtOAc extrahiert und auf Cellulose-Dünnschicht in CAW aufgetrennt. Nur die Extrakte aus FLS1- und ANS-Transformanten zeigten Aktivität mit DHK oder DHQ als Substrat, das zu Km bzw. Qu umgesetzt wurde, wobei FLS1 DHK und ANS DHQ bevorzugte.

In vitro Tests der FLS1, 3 und 5 in *E. coli* als Thioredoxin-Fusionsprotein (Owens et al., 2008) hatten zu dem gleichen Ergebnis geführt. Die At_FLS1 bevorzugt DHK (0,499 μ kat/kg, 100%) gegenüber DHQ (0,349 μ kat/kg, 70%). Außerdem hatten *in vitro* Studien an FLS aus *A. thaliana* (Prescott et al., 2002; Owens et al., 2008) und *C. unshiu* (Lukačín, 1997) gezeigt, dass FLS auch (2*S*)-NAR als Substrat zu Km umsetzen kann. Dabei werden Dihydroflavonole (DHK, DHQ) als Zwischenprodukte gebildet. Das unnatürliche (2*R*)-NAR wird dagegen nur zu (-)-*trans* DHK umgesetzt (Lukačín et al., 2003). Demnach kann die FLS die Reaktion der FHT übernehmen und zeigt somit eine geringe Substratspezifität im Vergleich zur FHT oder auch FNS I (Prescott et al., 2002; Gebhardt et al., 2007). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Proteinrohextrakt der At_FLS1 mit (2*S*)-NAR und (2*R*)-NAR auf Aktivität überprüft. Als (2*R*)-NAR wurde das Racemat (2*S*/2*R*)-NAR verwendet und als Kontrolle diente die FHT aus *F. x ananassa* (Fa_FHT), welche nur in der Lage ist, das (2*S*)-NAR zu (2*R*, 3*S*)-*cis*-DHK umzusetzen (Almeida et al., 2007). Die At_FLS1 zeigte mit (2*S*)-NAR einen kompletten Umsatz, wahrscheinlich über das (+)-*trans*-DHK als Zwischenprodukt zum Km. Die Fa_FHT zeigte wie erwartet, nur mit dem (2*S*)-NAR Aktivität und bildete das (+)-*trans*-DHK zu ca. 70%. Beim Racemat war gut zu erkennen, dass nur etwa die Hälfte, nämlich das enthaltene (2*S*)-NAR zum DHK umgesetzt wurde (**Abb. 30**). Dagegen zeigten die At_FLS3 und At_FLS5 auch mit unterschiedlichen Substraten oder bei verschiedenen Bedingungen, wie pH, Temperatur, Substrat- und Proteinmenge keine Aktivität.

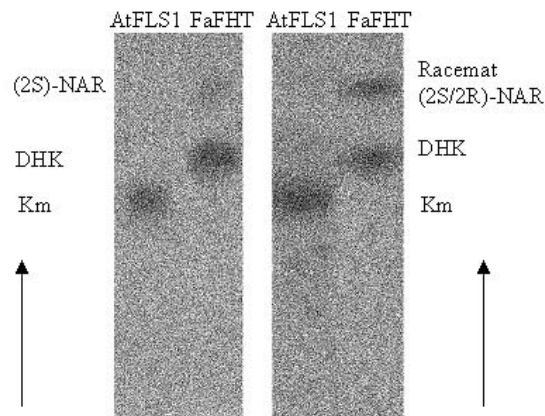


Abb. 30: Aktivitätsnachweis der At_FLS1 mit (2*S*)-NAR und dem unnatürlichen (2*R*)-NAR als ^{14}C -markierte Substrate. Die Auftrennung der extrahierten Produkte erfolgte mit Cellulose-Dünnschichtchromatographie in CAW. Als Kontrolle diente die Fa_FHT, welche nur das (2*S*)-NAR zu (+)-*trans*-DHK umsetzt.

Der Nachweis der ANS-Aktivität erfordert die Herstellung von instabilen Leucoanthocyanidinen (Lpg, Lcy) aus ^{14}C -markierten Dihydroflavonolen. Der Umsatz mit Leucoanthocyanidinen als Substrate erfolgte über eine Zwei-Schritt-Reaktion, in der die ^{14}C -markierten Dihydroflavonole (DHK; DHQ) mit Hilfe der DFR zu Leucoanthocyanidinen (Lpg, Lcy) umgesetzt wurden und durch die Zugabe von rekombinanter At_ANS das entsprechende Anthocyanidin (Pg, Cy) gebildet wurde. Der Grund für diese Zwei-Schritt-Reaktion ist die schwierige Synthese von ^{14}C -markierten Leucoanthocyanidinen und die Instabilität des unmarkierten („kalten“) Leucoanthocyanidins. Die At_ANS zeigte sowohl mit Lpg als auch mit Lcy Umsatz zu den entsprechenden Anthocyanidinen Pg und Cy (**Abb. 31**).

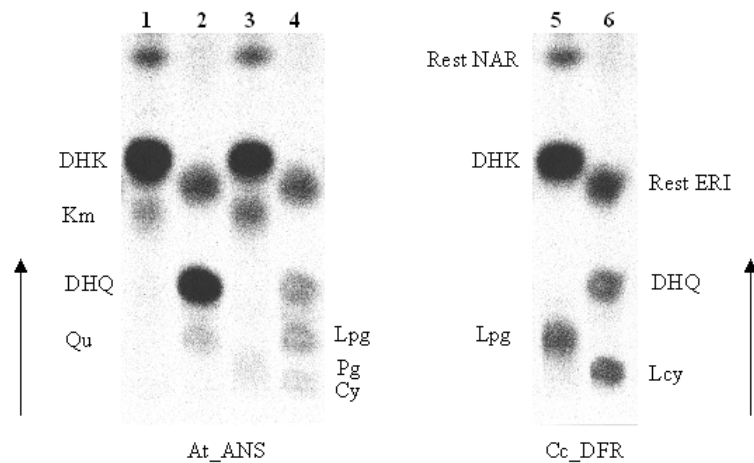


Abb. 31: Nachweis der ANS-Aktivität in Extrakten aus At_ANS-Hefetransformanten. Als Substrate wurden ^{14}C -markiertes DHK (Spur 1), DHQ (Spur 2), Lpg (Spur 3) und Lpg (Spur 4) eingesetzt, und die Produkte Km (Spur 1), Qq (Spur 2), Pg (Spur 3) und Cy (Spur 4) wurden durch Cellulose-Dünnschichtchromatographie in CAW aufgetrennt. Die Synthese von Lpg und Lcy, ausgehend vom DHK und DHQ, durch DFR aus *Callistephus chinensis* ist in den Spuren 5 und 6 dargestellt.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die ANS aus *A. thaliana* sowohl das *cis*-Lcy als auch das *trans*-Lcy zu den entsprechenden Anthocyanidinen umsetzt (Turnbull et al., 2003). Die ANS aus *M. domestica* zeigte ähnliche Ergebnisse, hier wurden zusätzlich das *cis*- und *trans*-Lpg als Substrate verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle Substrate akzeptiert, aber das natürliche *cis*-Lpg bzw. Lcy bevorzugt wurden (Yan et al., 2002). Bei der *Gerbera* ANS wurde auch (+)-Cat als Substrat eingesetzt und überraschenderweise zum Cy, Qu und einem C4-C4-Catechindimer umgesetzt (Wellmann et al., 2006). Aber auch *cis*- und *trans* Lcy wurden als Substrate akzeptiert, wobei DHQ und Qu als Nebenprodukte gebildet wurden (Turnbull et al., 2003; Yan et al., 2005; Wellmann et al., 2006).

Die ANS kann, wie auch die At_FLS1, zumindest *in vitro* mehrere Reaktionsschritte in der Flavonoidbiosynthese katalysieren. Die eigentliche Reaktion der ANS ist die Umsetzung von Leucoanthocyanidinen zu den Anthocyanidinen (Saito et al., 1999), aber sie kann auch Dihydroflavonole zu Flavonolen umsetzen (Welford et al., 2001) (2.5.1). Demnach kann theoretisch die Reaktion der FLS durch die ANS *in situ* übernommen werden. Des Weiteren ist der Umsatz von Flavanonen zu Dihydroflavonolen durch die ANS möglich, so dass FLS und ANS multifunktionell sind und keine enge Substratspezifität besitzen z. B. wie FHT, welche nur (2*S*)-NAR umsetzt. Der Enzymextrakt der Hefezellen, die At_ANS exprimieren, wurde mit DHK oder DHQ inkubiert und zeigte einen Umsatz zu Km (0,010 $\mu\text{kat/kg}$, 37%) bzw. Qu (0,015 $\mu\text{kat/kg}$, 55%) (Abb. 31).

5.2.3 Expression der At_FLS1, der putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3, 5 und der At_ANS in Bakterien

Aufgrund des allgemein bekannten Problems der geringen Expression von rekombinanten Proteinen in Hefen wurden die *A. thaliana* DNAs in den Bakterienvektor pDEST14 umkloniert.

Die Klonierung erfolgte auch hier mit Hilfe des Gateway Systems ausgehend von den At_FLS1, 2, 3, 5- und At_ANS- pDONR201-Konstrukten und die Expression erfolgte in *E. coli* BL21-A1. Die Rohextrakte der At_FLS1- und At_ANS-Transformanten zeigten mit DHK oder DHQ eindeutige Umsätze zu Km bzw. Qu (**Abb. 32**). Aber auch mit NAR und ERI wurden bei der At_FLS1 entsprechende Umsätze zu den jeweiligen Flavonolen beobachtet. Die At_ANS zeigte wie auch schon bei der Hefeexpression, mit Lpg und Lcy klare ANS Aktivität, wobei Pg und Cy gebildet wurden. Bei den putativen Flavonolsynthasen, At_FLS2, 3 und 5, konnte auch bei der Expression in Bakterien keine Aktivität beobachtet werden, was natürlich die Kontrolle beim Anreinigen dieser putativen FLS Proteine mittels Standardzymtest erschwerte (**Abb. 32**).

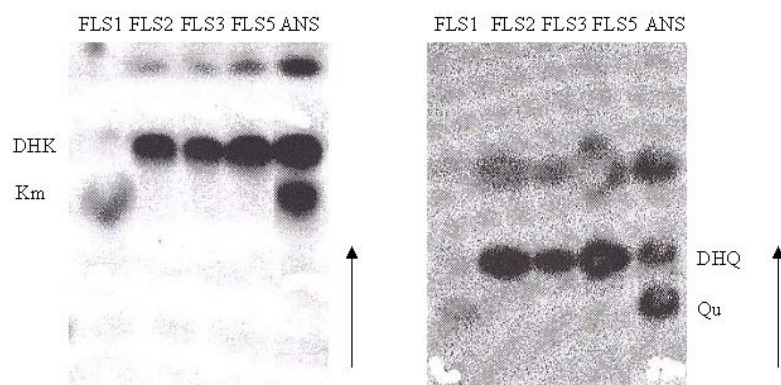


Abb. 32: Nachweis der FLS-Aktivität in Rohextrakten von *E. coli* transformiert mit At_FLS1, 2, 3, 5 oder At_ANS. Substrat und Produkte wurden nach Inkubation mit EtOAc extrahiert, auf Cellulose-Dünnschicht in CAW getrennt und durch Autoradiographie auf den Platten nachgewiesen. Nur die Extrakte von FLS1- und ANS-Transformanten zeigen einen Umsatz von DHK oder DHQ zu Km bzw. Qu.

5.3 Reinigung der At_FLS1 und der putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3, 5

Die fehlende Aktivität der putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3 und 5 stellt ein Problem dar, weil bei früheren Reinigungen von verwandten Enzymen bereits die Instabilität von 2-ODD's beobachtet wurde. Zum Beispiel wurde die Proteolyse der FHT aus Zellkulturen während der Extraktion von *P. hybrida* und in bakteriellen Proteinrohextrakten nachgewiesen (Britsch et al., 1992; Lukačin et al., 2000). Deshalb sollten die rekombinanten Proteine durch eine rasche und schonende Aufarbeitung partiell gereinigt und ihre Reaktion mit FLS-Antiserum in Western-Blots überprüft werden.

Der proteolytische Abbau von 2-ODD's kann durch eine Extraktion in leicht saurem Puffer und zweistufiger Fraktionierung begrenzt werden (Lukačin et al., 2000). Diese Reinigungsprozedur wurde erfolgreich für die Reinigungen der *Petunia* FHT, *Citrus* FLS und der *Petroselinum* FHT eingesetzt und deshalb auch für die Anreinigung der At_FLS1 und der putativen FLS (At_FLS2, 3 und 5) verwendet. Die Reinigung konnte allerdings nur für At_FLS1 mittels Aktivitätsmessung und SDS-PAGE überprüft werden.

5.3.1 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Vor der Größenausschlusschromatographie (SEC) wurden die Proteine des Rohextraktes (At_FLS1, 2, 3, 5) einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (30 - 80% Sättigung) unterzogen. Die nachfolgende SEC trennt nach Molekülgröße und nutzt die unterschiedliche Verteilung von Molekülen in der Gelmatrix und dem Fließmittel im Ausschlussvolumen. Dabei werden Salze und niedermolekulare Proteasen verzögert eluiert. Das verwendete Säulenmaterial Fractogel EMD BioSEC ermöglicht eine Trennung im Bereich zwischen 5 und 1000 kDa.

Die SEC erfolgte anfangs nur mit der At_FLS1, wobei etwa 70 % der Begleitproteine entfernt werden konnten. Dieses Ergebnis entsprach in etwa auch der Reinigung der *Citrus* FLS aus *E. coli*. Die At_FLS1 zeigt nach der SEC (**Abb. 33**) in 15 Fraktionen Aktivität. Diese Fraktionen wurden zusätzlich über SDS-PAGE überprüft. Nach der Überprüfung wurden Fraktionen 8-13 für den nächsten Reinigungsschritt, der Anionenaustauschchromatographie (DEAE), vereinigt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Nachdem die SEC mit der At_FLS1 erfolgreich war, konnten die restlichen Rohextrakte mit putativen

Flavonolsynthesen (At_FLS2, 3 und 5) analog fraktioniert werden. Die Kontrolle der Reinigung konnte nur über SDS-PAGE erfolgen in Ermangelung einer enzymatischen Aktivität. Entsprechend dem Protein-Elutionsprofils wurden bei der At_FLS2 die Fraktionen 10-13, bei der At_FLS3 die Fraktionen 10-12 und bei der At_FLS5 die Fraktionen 11-13 weiter verwendet (**Abb. 34**).

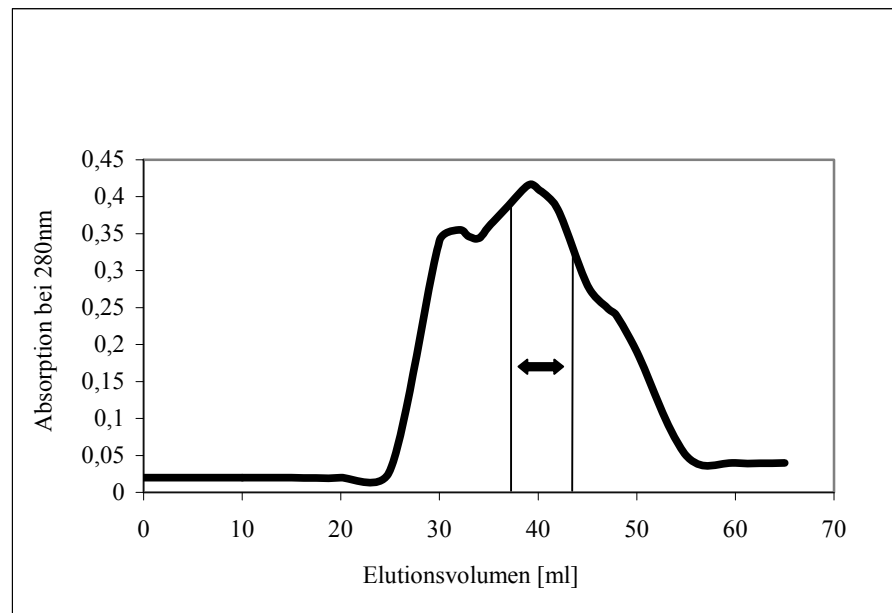


Abb. 33 Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie (SEC) von At_FLS1. Die mit Doppelpfeil gekennzeichneten aktiven Fraktionen (8 – 13) der At_FLS1 wurden für den nächsten Reinigungsschritt weiter verwendet wurden.

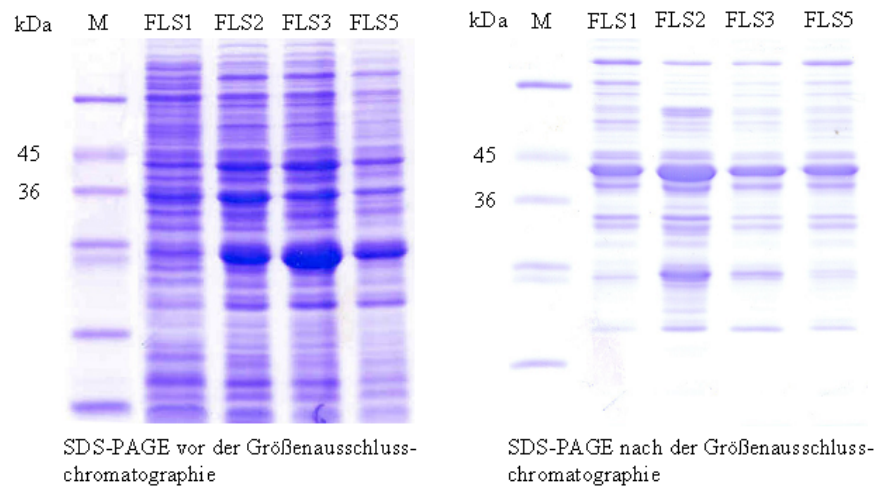


Abb. 34: Trennung von Extrakt aus At_FLS transformierten *E. coli* auf SDS-PAGE vor (Proteinrohextrakt) Die Rohextrakte (links) sowie die Extrakte nach der SEC (rechts) von *E. coli*, die At_FLS1 (Fraktionen 8-11) bzw. die putativen Flavonolsynthasen At_FLS2 (Fraktionen 10-13), 3 (Fraktionen 10-12) und 5 (Fraktionen 11-13).

5.3.2 Anionenaustauschchromatographie (DEAE)

Der nächste Reinigungsschritt für At_FLS1 und die putativen FLS Proteine stellte die Anionenaustauschchromatographie (DEAE) dar. Das verwendete Säulenmaterial Fractogel EMD DEAE besteht aus einem Grundgerüst von Methacrylat-Polymer, das mit flexiblen Ketten aus Diethylaminoethylgruppen (Tentakel-DEAE) verbunden ist und somit eine gute Anpassung der Aminogruppen an die Proteinoberfläche ermöglicht. Die Trennung auf DEAE basiert darauf, dass Proteine in schwach basischen Puffern oberhalb ihres isoelektrischen Punktes (pI) als Anionen vorliegen und dadurch reversibel an die positiven Ladungen des Säulenmaterials binden können.

Die DEAE (**Abb. 35**) wurde, wie schon die SEC, anfangs nur mit der At_FLS1 durchgeführt. Die nach der SEC gesammelten aktiven Fraktionen (6 ml) der At_FLS1 wurden über die DEAE aufgetrennt, Fraktionen (1 - 21) von 1,5 ml gesammelt und mittels Standardenzymtest und SDS-PAGE überprüft. Die Fraktionen 1-7 zeigten FLS-Aktivität, aber die Kontrolle über SDS-PAGE ergab ein ernüchterndes Ergebnis. Alle Fraktionen der At_FLS1 enthielten mehr Verunreinigungen (**Abb. 36**) als nach der SEC (**Abb. 34**), obwohl bei diesem Schritt der Reinigung der *Petunia* FHT und der *Citrus* FLS apparent homogene Enzyme erhalten wurden. Aus diesem Grund wurden die putativen Flavonolsynthasen (At_FLS2, 3 und 5) nicht weiter über die DEAE gereinigt. Für die Westernblot-Analyse reichte der Reinigungsgrad der einzelnen Fraktionen nach der SEC völlig aus.

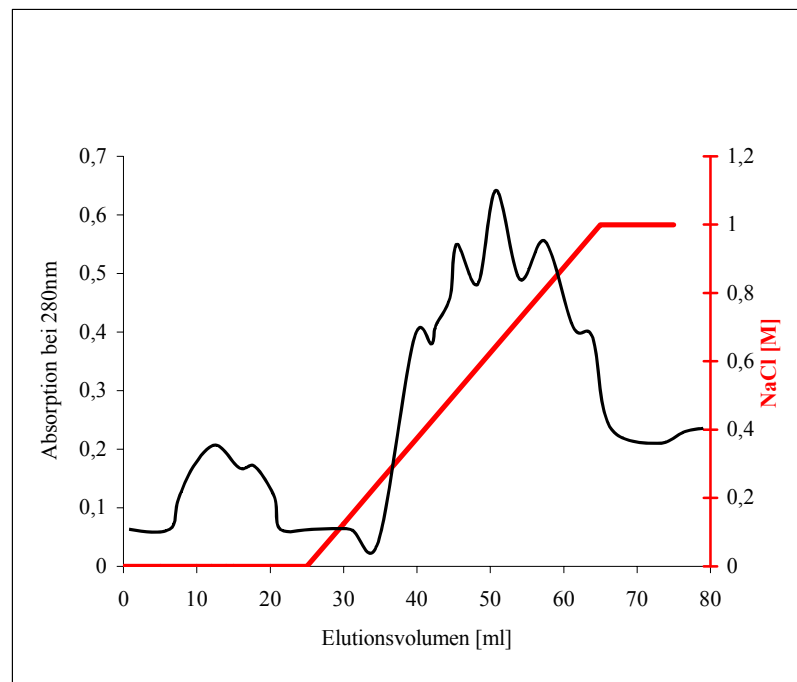


Abb. 35: Elutionsdiagramm der Anionenaustauschchromatographie (DEAE) von Extrakt aus At_FLS1-transformierten *E. coli* nach SEC. Die Elution erfolgte im linearen NaCl-Gradienten und 21 Fraktionen wurden gesammelt, wobei die Fraktionen 1-7 FLS-Aktivität zeigten.

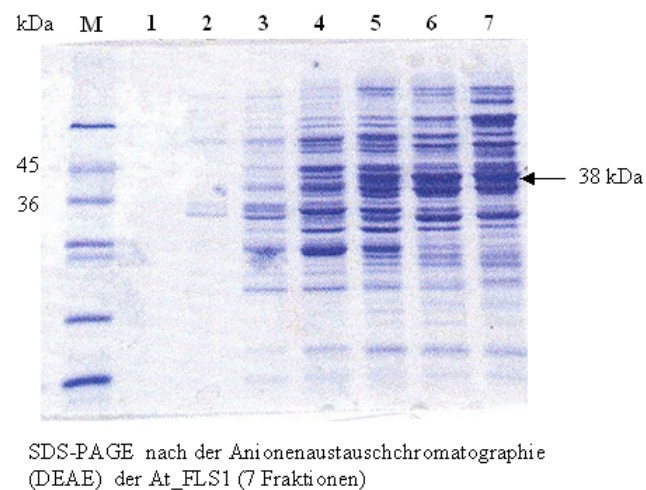


Abb. 36: Kontrolle der Trennung von At_FLS1-Extrakt (Fraktionen 1-7) auf SDS-PAGE nach DEAE. Die FLS1-Bande bei 38 kDa konnte nicht mehr eindeutig identifiziert werden.

5.3.3 Westernblot-Analyse mit der At_FLS1 und den putativen Flavonolsynthasen At_FLS2, 3 und 5

Nachdem die Fraktionierung der At_FLS1 auf DEAE kein günstiges Ergebnis zeigte, wurden die entsprechenden Fraktionen nach der SEC von At_FLS1 und der putativen FLS Proteine (At_FLS2, 3 und 5) einer Westernblot-Analyse unterzogen. Hiermit sollte geklärt werden, ob die Expression erfolgreich war und ob die Produkte die typische Größe der FLS aufweisen.

Der Nachweis (**Abb. 37**) erfolgte mit dem *Citrus* FLS-Antiserum aus Kaninchen und einem polyklonalen Anti-Rabbit-IgG-Serum aus der Ziege, gekoppelt an alkalische Phosphatase, mit NBT und BCIP (**4.11.3**). Das *Citrus*-FLS-Antiserum wurde wegen der hohen Sequenzähnlichkeit der *Citrus* FLS zur *Arabidopsis* FLS verwendet. Der Westernblot zeigte, dass die putativen FLS Proteine, At_FLS2, 3 und 5, in der denaturierenden SDS-PAGE gleiches Laufverhalten wie At_FLS1 aufweisen. Die Kreuzreaktion aller vier Flavonolsynthasen mit dem FLS-Antiserum ist ein Ergebnis der ähnlichen Primärstrukturen. Somit wurden At_FLS2, 3 und 5 rekombinant exprimiert und nicht nennenswert abgebaut, wiesen aber keine Aktivität auf.

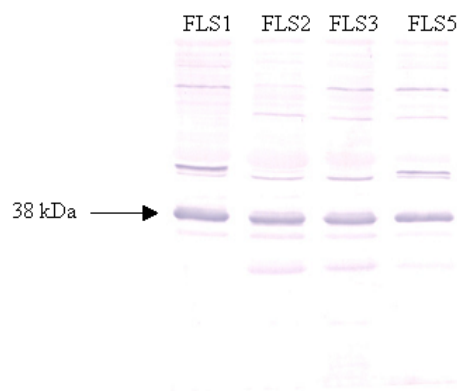


Abb. 37: Westernblot-Analyse der rekombinanten At_FLS1, 2, 3 und 5 nach fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und Größenaufschlusschromatographie. Die partiell gereinigten Extrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem *Citrus*-FLS-Antiserum aus Kaninchen und einem polyklonalen Anti-Rabbit-IgG-Serum aus Ziege auf FLS-Expression überprüft.

5.4 Reinigung der At_ANS

5.4.1 Reinigung der At_ANS über eine Ni-Affinitätssäule (IMAC)

Für die His-Tag Reinigung der At_ANS über eine Ni-Affinitätssäule wurde im pYES2.1 TOPO Vektor exprimiert, der am C-terminalen Ende einen entsprechenden Tag aufweist. Dieser His-Tag besteht aus 6 Histidinresten, die durch Komplexierung mit Ni-Ionen einer Affinitätssäule die Abtrennung von nicht gebundenen Begleitproteinen ermöglichen. Durch die Zugabe einer geringen Konzentration (5 mM) an Imidazol, einem kompetitiven Ni-Liganden, in den IMAC-Waschpuffer (4.5.6) wird eine unspezifische Bindung von Histidinreichen Begleitproteinen vermieden bzw. vermindert. Die Elution erfolgt durch höhere Konzentration (500 mM) an Imidazol im IMAC-Elutionspuffer (4.5.6). Die At_ANS im pCR 2.1 TOPO Vektor wurde von Dr. Ralf Stracke (Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe einer Proofreading-PCR und genspezifischen End-to-End Primern (AtLDOX2.1f, AtLDOX2.1r) wurde die At_ANS amplifiziert. Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde durch die Topoisomerase-Reaktion in den pYES2.1 TOPO Vektor eingebaut (4.12.3) und durch Transformation in INV *Sc1*-Zellen (Hefestamm) zur Expression gebracht. Der Rohextrakt der At_ANS-Transformanten zeigte mit DHK oder Lpg Enzymaktivität, wobei Km und Pg gebildet wurden. Der Rohextrakt wurde anschließend nach der Batch-Methode (4.13.4.) über den His-Tag fraktioniert, wodurch eine apparent homogene At_ANS, wie bei der *Petroselinum* FHT und FNS I (Gebhardt et al., 2007), in einem Reinigungsschritt erhalten werden konnte. Die Reinigung über His-Tag wurde durch einen Standardenzymtest und SDS-PAGE (Abb. 38) überprüft, und das Fusionsprotein weist durch den His-Tag eine Molekülmasse von etwa 45 kDa auf.

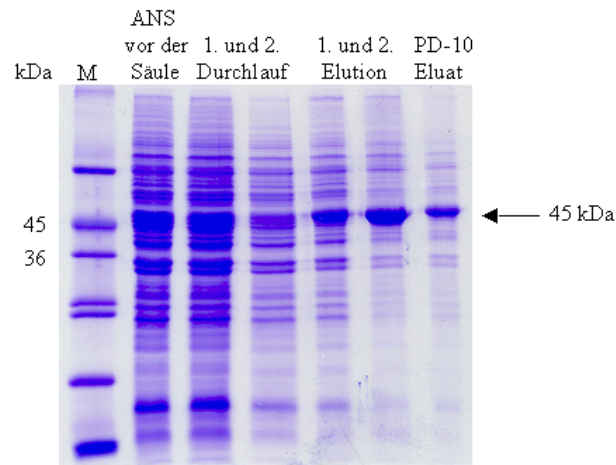


Abb. 38: Kontrolle der Reinigung von His-Tag At_ANG durch SDS-PAGE. Der Extrakt aus His-Tag-transformierter Hefe wurde auf die Säule aufgetragen, 30 min bei 4°C geschüttelt und die ungebundenen Proteine durchlaufen gelassen (1. Durchlauf). Die gebundenen Proteine wurden mit einem Säulenvolumen Waschpuffer (4.5.6) gewaschen (2. Durchlauf) und anschließend mit einmal 500 µl (1. Elution) und einmal 3 ml (2. Elution) Elutionspuffer eluiert. Das 2. Eluat wurde anschließend über eine PD10-Säule umgepuffert (0,1 M KPi pH 6,5).

Im Standardenzymtest zeigte die At_ANG, sowohl in der 2. Elution nach der His-Tag-Reinigung als auch im PD10-Eluat mit ^{14}C -markierten DHK und Lpg einen Umsatz zum Km bzw. Pg (**Abb. 39**).

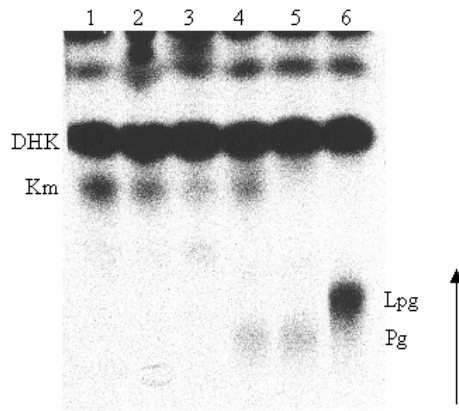


Abb. 39: Nachweis der ANS-Aktivität von At_ANS in Hefe nach der Reinigung über His-Tag. Die Inkubation wurde mit ^{14}C -markiertem DHK oder Lpg durchgeführt, und die Auswertung erfolgte durch dünnsschichtchromatographische Auftrennung in CAW. Dabei zeigte der Rohextrakt mit DHK (Spur 1) und Lpg (Spur 4) einen Umsatz zum Km bzw. Pg, sowie die 2. Elution mit DHK (Spur 2) und das PD10-Eluat mit DHK (Spur 3) und Lpg (Spur 5). Als Kontrolle für die Lpg-Synthese wurde die Reaktion ausgehend vom DHK durch *Callistephus* DFR mitaufgetragen (Spur 6).

Das Ziel dieser Reinigung der At_ANS war zusätzlich die biochemische Charakterisierung (Temperatur-, pH-Optimum, Zeitlinearität und Proteinmenge) des Enzymes, aber nach wiederholtem Aufschluss mit anschließender Reinigung über die Ni-Affinitätssäule konnten Schwankungen in der Enzymaktivität der At_ANS beobachtet werden. Das erschwerte die biochemische Charakterisierung. Ähnliche Probleme wurden auch bei der Reinigung der ANS aus *Perilla frutescens* (Saito et al., 1999) beobachtet. Hier zeigte die ANS nach der His-Tag-Reinigung keine Aktivität mehr. Ein Grund für die Inaktivität oder auch die Aktivitätsschwankungen könnte in der Instabilität der ANS liegen, die mit der Abwesenheit von DTT zusammenhängen könnte. Das DTT kann zum Beispiel durch die Ni-Ionen der Affinitätssäule abgefangen werden. Aufgrund dieser Möglichkeit wurde die His-Tag-Reinigung der At_ANS, mit zusätzlich zugefügten DTT im IMAC-Elutionspuffer (4.5.6) durchgeführt (Abb. 40), aber auch hier konnten Schwankungen in der Enzymaktivität festgestellt werden. Die Abbildung 41 zeigt einen Standardenzymtest nach der His-Tag-Reinigung mit DTT. Die At_ANS zeigte vor der Reinigung Aktivität mit DHK, DHQ, Lpg und Lcy, obwohl der Umsatz zu Km und Pg schwach war, konnten Qu und Cy in deutlichen Mengen gebildet werden. Bei dem 2. Eluat waren die Umsätze etwas schwächer oder wie beim Lcy gar nicht mehr vorhanden.

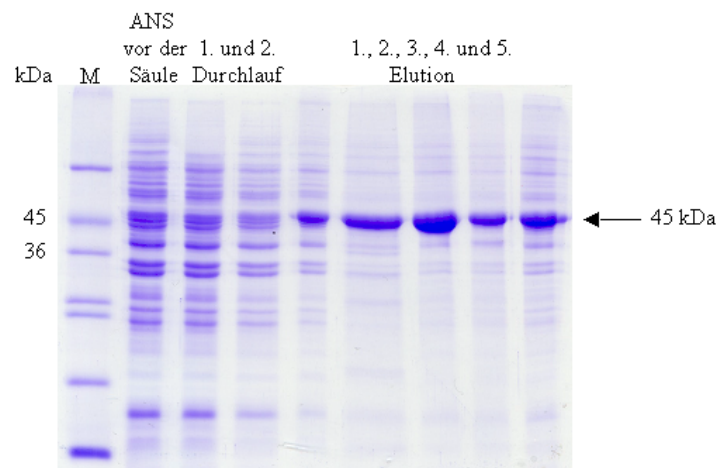


Abb. 40: Kontrolle der Reinigung der His-Tag-At_ANS mit DTT im IMAC-Elutionspuffer über SDS-PAGE. Das SDS-PAGE zeigt den Rohextrakt, den 1. Durchlauf mit ungebundenen Proteinen, den Waschschriff als 2. Durchlauf und die fünf Elutionen mit je 500 µl IMAC-Elutionspuffer, wobei ein Bande bei 45 kDa identifiziert werden konnte.

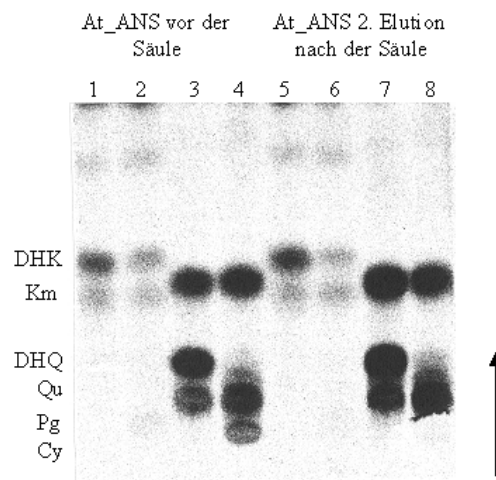


Abb. 41: Standardenzymtest nach der His-Tag At_ANS Ni-Affinitätssäule. Die Inkubation des At_ANS Rohextrakts und der zweite Elution erfolgte mit ^{14}C -markierten DHK, DHQ, Lpg und Lcy als Substrate. Die Produkte wurden nach der Inkubation mit EtOAc extrahiert und durch Cellulose-Dünnschichtchromatographie in CAW aufgetrennt. Der Rohextrakt setzt DHK (Spur 1) zu Km, Lpg (Spur 2) zu Pg, DHQ (Spur 3) zu Qu und Lcy (Spur 4) zu Cy um. Das zweite Eluat zeigte schwächere Umsätze mit DHK (Spur 5) zu Km, Lpg (Spur 6) zu Pg, DHQ (Spur 7) zu Qu und Lcy (Spur 8) zu Cy.

Nicht nur die ANS aus *A. thaliana* zeigte nach der Reinigung über eine His-Tag-Säule Aktivitätsverluste. Auch bei der FHT aus *A. thaliana* konnte beobachtet werden, dass sie nach der Reinigung eine wesentliche geringere Aktivität zeigte (Owens et al., 2008). Vermutet wurde zum Einen die einhergehende Proteolyse (Lukačín et al., 1997) und zum anderen die beschriebene Instabilität von gereinigten 2-ODD's.

5.4.2 Reinigung der At_ANS über eine Amylose-Affinitätssäule

Aufgrund der Aktivitätsschwankungen bei der His-Tag-Reinigung wurde eine andere Reinigungsmethode für die At_ANS verwendet: die Reinigung über eine Amylose-Affinitätssäule (Saito et al., 1999).

Für die Expression der At_ANS wurde der pMal-c4x Vektor ausgewählt, dessen *malE* Gen das „maltose-binding-protein“ (MBP) kodiert und so die cytoplasmatische Expression des Fusionsproteins ermöglicht. Die Bildung des Fusionsproteins erfolgt über die Fusion des Zielproteins (At_ANS) mit dem C-Terminus des MBP und ermöglicht dadurch eine bessere Proteinexpression (Maina et al., 1988). An der Fusionsstelle enthält das Fusionsprotein zusätzlich die Erkennungssequenz für den Blutgerinnungsfaktor Xa Protease. Durch diese Protease kann das Zielprotein nach der Reinigung mittels Amylose-Affinitätschromatographie von dem MBP abgespalten werden. Die At_ANS wurde erneut über eine Proofreading-PCR mit genspezifischen End-to-End Primern (AtLDOXpMALf, AtLDOXpMALr) amplifiziert. Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstelle des Polylinkers in den pMal-c4x Vektor kloniert und durch Transformation in K12TB1-Zellen (*E. coli* Stamm) zur Expression gebracht. Aus dem Rohextrakt der Zellen in pMal-Aufluspuffer (4.5.6) wurde das At_ANS/MBP-Fusionsprotein über eine Amylose-Affinitätssäule (4.13.5) gereinigt. Wie schon bei der His-Tag-Reinigung konnte hier apparent homogenes At_ANS/MBP-Fusionsprotein in einem Reinigungsschritt erhalten werden. Die Reinigung wurde durch einen Standardenzymtest (Abb. 42) und SDS-PAGE (Abb. 43) überprüft. Das At_ANS/MBP-Fusionsprotein besitzt eine Molekülmasse von ungefähr 85 kDa, die sich aus der At_ANS (42 kDa) und dem MBP (42.5 kDa) zusammensetzt.

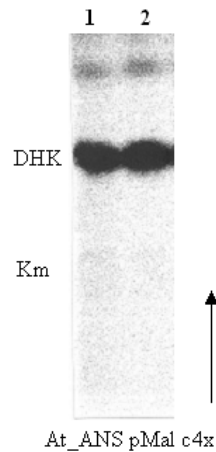


Abb. 42: Test auf FLS-Aktivität der At_ANS pMal c4x mit ^{14}C -markierten DHK als Substrat und dünnschichtchromatographische Auftrennung in CAW. Zum Test wurde der Rohextrakt (Spur 1) aus transformierten *E. coli* und die Fraktion nach Reinigung über MPB-Bindung (At_ANS/MPB-Fusionsprotein) (Spur 2) eingesetzt.

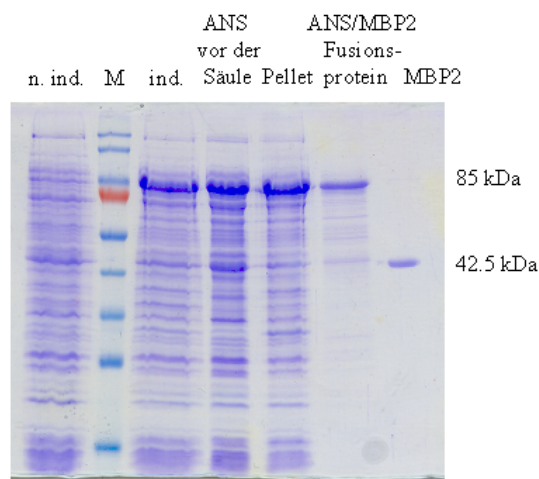


Abb. 43: Kontrolle der Reinigung von At_ANS/MPB über eine Amylose-Affinitätssäule durch SDS-PAGE. Eine Bande bei 85 kDa für das At_ANS/MPB-Fusionsprotein konnte in der induzierten Fraktion, im Rohextrakt, im Pellet und nach der Reinigung beobachtet werden. Das MPB2 (42,5 kDa) wurde als Kontrolle mitaufgetragen.

Weder im Rohextrakt aus At_ANS/MPB-transformierten *E. coli* noch in der Amylose-Affinitätssäule-gereinigten Fraktion konnte unter Standardbedingungen und mit DHK als Substrat Aktivität nachgewiesen werden. Bei dem *Perilla* ANS/MBP-Fusionprotein konnte jedoch vor und nach der Amylose-Affinitätschromatographie Aktivität beobachtet werden, wobei die Aktivität der gereinigten Fraktionen gegenüber dem Rohextrakt etwas schwächer ausfiel. Nach der Abspaltung des MBP von der *Perilla* ANS durch den Protease Faktor Xa konnte ebenfalls eine Aktivität nachgewiesen werden, die aber nur noch 10-20% ausmachte

(Saito et al., 1999). Dieser Aktivitätsverlust ist wahrscheinlich das Ergebnis der Instabilität der aktiven Form des ANS Proteins, was aber nicht durch Stabilitätsuntersuchungen überprüft wurde.

Ein weiteres Problem bei der Reinigung des At_ANS/MBP-Fusionsprotein entstand bei der Abspaltung des MBP von der At_ANS nach der Amylose-Affinitätssäule. Die Abspaltung wurde nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt/Main) in kleinem Maßstab durchgeführt und mittels SDS-PAGE überprüft (**Abb. 44**). Das Ergebnis des SDS-PAGE ist ernüchternd, da sowohl in der Kontrolle als auch in dem Abspaltungsansatz in der Höhe von ungefähr 85 kDa keine Bande beobachtet werden konnte (vgl. **Abb. 43**). Vermutlich ist das At_ANS Protein schon bei der Aufkonzentration (1 mg/ml At_ANS/MBP-Fusionproteinextrakt) mit Centriprep abgebaut worden und somit nicht mehr nachweisbar, was natürlich die biochemische Charakterisierung der At_ANS mit dem MBP-Fusionprotein erschwerte, obwohl die Reinigung mit Hilfe eines MBP-Fusionproteins über eine Amylose-Affinitätssäule bereits erfolgreich beschrieben wurde (Guan et al., 1988; Maina et al., 1988, Saito et al.; 1999).

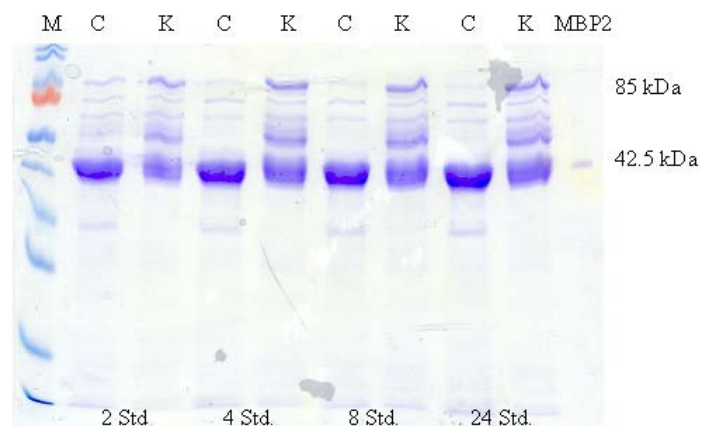


Abb. 44: Überprüfung der Abspaltung der At_ANS vom At_ANS/MBP-Fusionsprotein durch SDS-PAGE. Die Abspaltung erfolgte nach Konzentrierung des At_ANS/MPB-Fusionsproteins (1 mg/ml) mit Centriprep im Zeitraum von 2-24 Stunden auf Eis. Das At_ANS Protein konnte nicht mehr nachgewiesen werden. C: Spaltungsansatz, K: Kontrollansatz.

Sowohl die His-Tag-Reinigung als auch die Amylose-Affinitätschromatographie ergaben angereinigte At_ANS Fusionsproteine, aber die Aktivitätsschwankungen nach His-Tag-Reinigung und die fehlende Aktivität bei dem MBP-Fusionprotein machten die biochemische Charakterisierung der At_ANS unmöglich.

5.5 Sequenzanalyse

Die biochemischen Untersuchungen des Pflanzenmaterials von *A. thaliana* Wildtyp (*Col-0*) und den Mutanten (*fls1-2m* und *ldox/fls1-2m*) ergaben, dass alle drei Genotypen Flavonole (Km, Qu) in den Geweben enthalten (5.1.2). Die Flavonolbildung in der *fls1-2m* Mutante könnte entweder durch die ANS oder durch eine der putativen Flavonolsynthasen (At_FLS2, 3 und 5) erfolgen. Dass die ANS in der Lage ist, zumindest *in vitro* Dihydroflavonole zu den Flavonolen umzusetzen, wurde bereits im Kapitel 5.2.2 gezeigt. Allerdings enthält auch die *ldox/fls1-2m* Mutante Flavonole, jedoch in signifikant geringerer Menge (Abb. 26) (5.1.2.). Dieses Ergebnis zeigt, dass *in situ* neben der ANS (und FLS1) eine weitere FLS an der Flavonolbildung beteiligt sein kann. Damit konzentriert sich das Augenmerk auf die FLS2, 3 und 5 Isoenzyme, obwohl bisher für diese Proteine keine Aktivität nachgewiesen werden konnte (Owen et al., 2008). At_FLS4 und At_FLS6 wurden bereits früher als Pseudogene identifiziert und spielen für die Betrachtung keine Rolle. Zum Beispiel enthält At_FLS4 ein zusätzliches Intron und ist durch „missplicing“ stark verkürzt (Stracke et al., 2009), während At_FLS6 ein vorzeitiges Stopcodon und ein zweites Exon enthält (Owens et al., 2008; Stracke et al., 2009). Zudem konnten keine entsprechenden EST's identifiziert werden (Stracke et al., 2009).

Pflanzliche 2-ODD's enthalten verschiedene konservierte Bereiche für die Bindung von Kofaktoren, Eisen, 2-Oxoglutarat und Substrat. Zudem besitzen die bekannten *A. thaliana* FLS- und ANS-Sequenzen eine auffallend hohe Homologie (Abb. 45). Das konservierte Sequenzmotiv H x D ... H für die Eisenbindung wurde in allen 2-ODD's nachgewiesen, wobei x eine nicht konservierte Aminosäure darstellt. Im Abstand von 10 Aminosäuren zum zweiten Histidin des Eisenbindungsmotivs folgt das Sequenzmotiv für die 2-Oxoglutaratbindung, das sich aus R x S zusammensetzt (x nicht konservierte Aminosäure). Fünf weitere konservierte Aminosäuren sind wichtig für die Aktivität von 2-ODD's und vermutlich an der Substratbindung beteiligt (Histidin, 2 x Phenylalanin, Lysin und Glutamin), wobei die ANS eine Ausnahme darstellt, da ein Tyrosinrest den Histidinrest ersetzt (Abb. 45). Diese

konservierten Motive der 2-ODD's konnten auch in FHT und FNS I aus *P. crispum* gezeigt werden (Gebhardt et al., 2007). Mutationen der Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind, können die Aktivität beeinflussen. Zum Beispiel bewirkte der Austausch des ²⁰²Lys bzw. des ²⁹³Phe bei der *Arabidopsis* FLS eine Abnahme in der Aktivität (Chua et al., 2008).

Die Polypeptide At_FLS2, 3, 5 und At_ANS weisen Unterschiede zu At_FLS1 im aktiven Zentrum und in vermuteten Substratbindungsstellen auf. Die Nummerierungen der einzelnen Aminosäuren beziehen sich auf die At_FLS1. At_FLS2 enthält ein vorzeitiges Stopcodon und kodiert ein stark verkürztes Peptid (Fehlen der C-terminalen Region) mit unvollständiger Eisenbindungsstelle, weil ³²⁵His fehlt. Außerdem fehlt das komplette Sequenzmotiv für die 2-Oxoglutaratbindung (Chua et al., 2008; Owens et al., 2008; Stracke et al., 2009). Darüberhinaus sind zwei Austausche, ¹⁴⁹Asp/His und ²¹⁹Lys/Arg vorhanden, welche für die Substratbindung und für die Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum wichtig sind. Zusätzlich fehlen zwei Aminosäuren, ³²⁵Phe und ³²⁷Glu, die für die Substratbindung wichtig sind, was erklärt, dass keine Aktivität *in vitro* oder *in vivo* gefunden wurde. Außerdem enthält die At_FLS2 ein zweites Intron und ein drittes Exon, das wiederum zur Verschiebung des Leserasters und zum verkürzten Protein durch Fehlen des C-terminalen Bereichs für die 2-Oxoglutarat- und Eisenbindungsstelle führt (Stracke et al., 2009). Die Aminosäuresequenz von At_FLS5 weist zwei Austausche im Bereich der Substratbindung, ²¹⁹Lys/Arg und ³²⁷Glu/Ala, auf. Die Sequenzen von At_FLS1, At_FLS3 und At_ANS zeigen sowohl in den Sequenzmotiven für die Bindung der Kofaktoren, Eisen und 2-Oxoglutarat als auch in dem Substratbindungsmotiv hohe Gemeinsamkeiten. Alle bekannten konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums stimmen überein, aber in der Nähe des 3'-Endes fehlt eine kleine Region, welche die Aktivität beeinflussen kann (Owens et al., 2008). Demnach könnte die At_FLS3 zusätzlich zur At_FLS1 und At_ANS in der Lage sein, Flavanone bzw. Dihydroflavonole zu Flavonolen umzusetzen.

AT_FLS1	DIEGYGTKLQKDPEGKKA	VDL	FLHRIWPPSCVNYR	FWPKNPPEYREVNEEY	AVHVKKLS	170									
AT_FLS3	DIEGYRTKYQKDLEGRNA	VDL	FLHRIWPPSRVNHK	FWPKNPPEYIEVN	EYASHIKKLS	141									
AT_FLS2	DFEGYTTNL-KYVKG-E	VW	TENLFLHRIWPPTC	INF	DYWPKNPPQYREVIEEY	TKETKKLS 144									
AT_FLS5	DFEGYKKN---	YLGGINNWDE	FLHRLSPPSI	IN	KYWPKNPPQYREVTEEY	TKHMKRLT 154									
AT_ANS	KIQGYGSKLANNASGQ	LEWEDY	FFHLAYPEEK	RDL	SIWPKTPSDYIEATSEY	AKCLRLLA 180									
	.::**.	:	*	*	:::*	:	***.	.*	..	***	:	*	*		
AT_FLS1	ETLLGILSDGLGLKRDAL	KEGLGG-EMAEY	MMK	IN	YPPCPRPDALGVPA	HTDL	SGITL	229							
AT_FLS3	EKIMEWLSEGLGLRHEAL	KEGLGG-ETIEY	LMK	IN	YPPCPDPELVVGAP	DHTD	VNGITL	200							
AT_FLS2	ERILGYLSEGLGLPSEAL	IQGLGG-ESTEY	VMR	IN	NYPPDPKPD	TL	GLVPEHTDI	IGITI 203							
AT_FLS5	EKILGWLSEGLGLQRET	FTQS	IGG-DTAEY	VL	RNVFYPPTQ	DT	ELVIGAAHS	DMGAIAL 213							
AT_ANS	TKVFKALS	VGLGLEPDRLEKEV	GGLEELLQ	MMK	IN	YPKCPQPELALGV	EAHTD	V	SALTF 240						
	:	:	**	****	:	:	:	::*	**	.	.*	..	***	:	:::
AT_FLS1	LVPNEVPGLQVFKDDH	WFDAEY	IPSAVIVHIGDQ	IL	RLSNGRYKNVL	HRT	TV	DKEK	TRMS 289						
AT_FLS3	LVANEALGLQAFKDNQ	WIDAEY	TTSGI	I	VIIGDQFL	MSNGKYKSVE	HRAKMD	KEK	TRIS 260						
AT_FLS2	IITNEVPGLQIFKDDH	WLDVHY	IPSSITV	NIGDQ	IMAEQWKVQ	ECVA	-----		250						
AT_FLS5	LIPNEVPGLQAFKDEQ	WLDLDY	IDS	AVV	IIGDQ	LMRMTNGRL	KNVL	HRAK	SDKDKL	TRIS 273					
AT_ANS	ILHNMV	PGLQLFYEGKW	VTAK	VPDS	IVMHIGD	TLEIL	SNGKYKS	SIL	H	RGLVNKEK	VRIS 300				
	:	:	*	.	***	*	:	::.	..	:	:	:	:	:	:
AT_FLS1	WPV	FL	EP	PREK	IVG-PL	PELT-GDDN	PPKFKP	FAFKDYSYR	KL	NKLPLD	-----	336			
AT_FLS3	WPV	FL	ESS	LDQ	VFG-PL	PELITG	DENV	PKFKP	YVYKDYK	FRKL	KLLLD	-----	308		
AT_FLS2	-----														
AT_FLS5	WPV	FL	VAP	RAD	MSVG-PL	PEFT-GD	ENPPKF	ETLI	YNDYIDQ	KIRG	WALED	LPVY	-----	325	
AT_ANS	WAV	FL	CE	PP	KDKIVL	KPLPEMV-S	VESPAK	FP	PR	TFAQH	IEHKL	FGKEQEEL	VSEKND	KGE 359	

Abb. 45: Multialignment von At_FLS und der At_ANS Proteinen. Substratbindung, Eisenbindungsmotiv, 2-Oxoglutaratbindungsmotiv.

5.6 Homologiemodelle von At_FLS1, At_FLS3 und At_ANS

Für Abschätzung einer FLS-Aktivität der At_FLS3 wurde zunächst die Struktur des Proteins mit Hilfe von Homologiemodellen errechnet. Die ähnliche Tertiärstruktur von nahe verwandten Proteinen erlaubt mit Hilfe des Homologiemodells eine Vorhersage hinsichtlich der räumlichen Anordnung, des aktiven Zentrums und der Substratorientierung im aktiven Zentrum eines Proteins. Benötigt wird dafür die Kristallstruktur eines verwandten Proteins (z.B.: ANS und FLS), wobei die Sequenzhomologie mindestens bei 30 % liegen sollte.

5.6.1 Kristallstruktur der At_ANS

In der Vergangenheit wurden verschiedene Vertreter der 2-ODD's kristallisiert und strukturell konservierte Bereiche identifiziert (Roach et al., 1995; Valegård et al., 1998; Zhang et al., 2000; Clifton et al., 2001). Alle Enzyme enthalten das sogenannte „jelly-roll“ Motiv aus zwei β -Faltblattstrukturen, die jeweils aus vier Strängen zusammengesetzt sind. Die ANS enthält zusätzlich drei α -Helices, die die „jelly-roll“ Struktur umschließen (Wilmouth et al., 2002).

Außerdem besitzt die ANS zwei zu einer α -Helix parallel ausgerichteten β -Faltblattstrukturen. Des Weiteren befindet sich am N-terminalen Ende der „jelly-roll“ Struktur eine lange α -Helix, die vermutlich als strukturelles Rückgrat dient. Am C-Terminus der ANS geht eine flexible Schleife in eine α -Helix über und könnte somit einen Deckel für das aktive Zentrum bilden (Wilmouth et al., 2002).

Aufgrund der Homologie von 60 - 70% zwischen FLS- und ANS-Sequenzen ist es möglich, basierend auf der Kristallstruktur der ANS aus *A. thaliana*, ein Strukturmodell für die At_FLS1 und At_FLS3 zu erstellen. Ein besonderer Vorteil ist in diesem Fall, dass die Strukturen von At_ANS-NAR bzw. At_ANS-DHQ Co-Kristallen ermittelt worden waren. NAR und DHQ sind auch Substrate der FLS. Demnach stand ein Homologiemodell für die At_FLS1 und At_FLS3 mit den natürlichen Substraten zur Verfügung. Die Homologiemodelle wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Alex Hildebrecht (AG Prof. Dr. Klebe, Philipps-Universität Marburg) mit dem Programm SWISSModell angefertigt und konnten anschließend mit Hilfe von Pymol abgebildet werden.

Die Ergebnisse der Homologiemodelle von der At_FLS1 (**Abb. 47**) und At_FLS3 (**Abb. 48**), basierend auf der ANS (**Abb. 46**) aus *A. thaliana*, ergaben hohe strukturelle Ähnlichkeiten untereinander. Die Modelle von At_FLS1 und At_FLS3 besitzen neben der charakteristischen „jelly-roll“ Struktur auch die lange α -Helix am N-terminalen Ende dieser Struktur. Außerdem konnte am C-Terminus der Übergang der flexiblen Schleife in die α -Helix beobachtet werden. Unterschiede wurden durch das Fehlen der N-terminalen Region in den Homologiemodellen von At_FLS1 und At_FLS3 gegenüber der At_ANS sichtbar. Aufgrund der schlechten Kristallisationsergebnisse im N-Terminus, konnte keine genaue Auswertung in dieser Region erfolgen und keine eindeutige Strukturvorhersage getroffen werden.

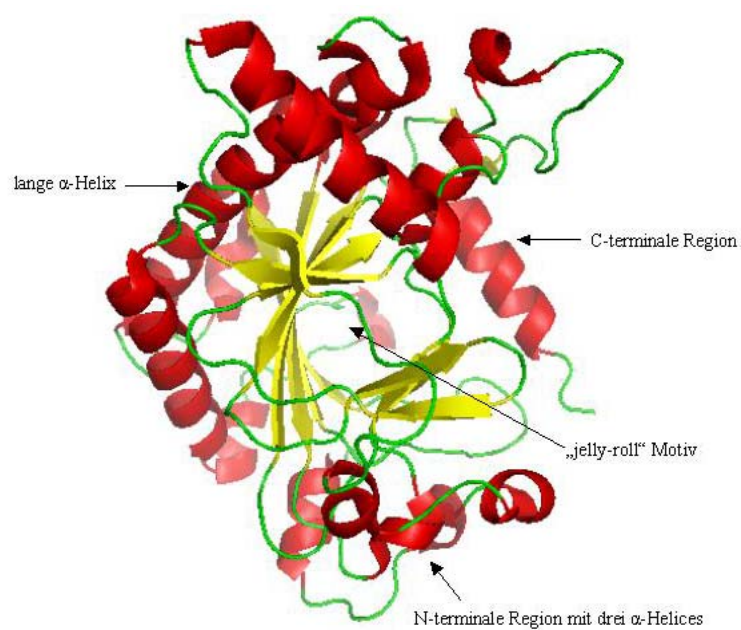


Abb. 46: Tertiärstruktur von der ANS aus *A. thaliana*.

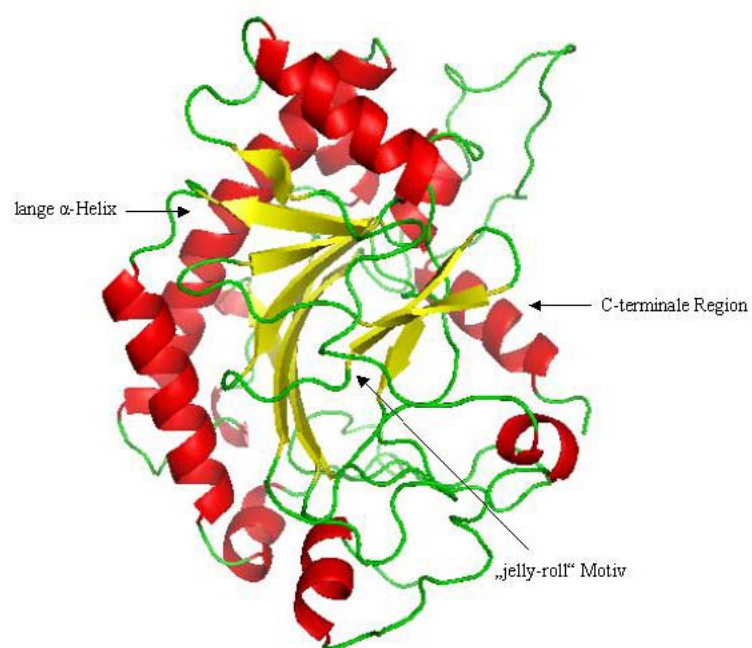


Abb. 47: Homologiemodell von der FLS1 aus *A. thaliana*.

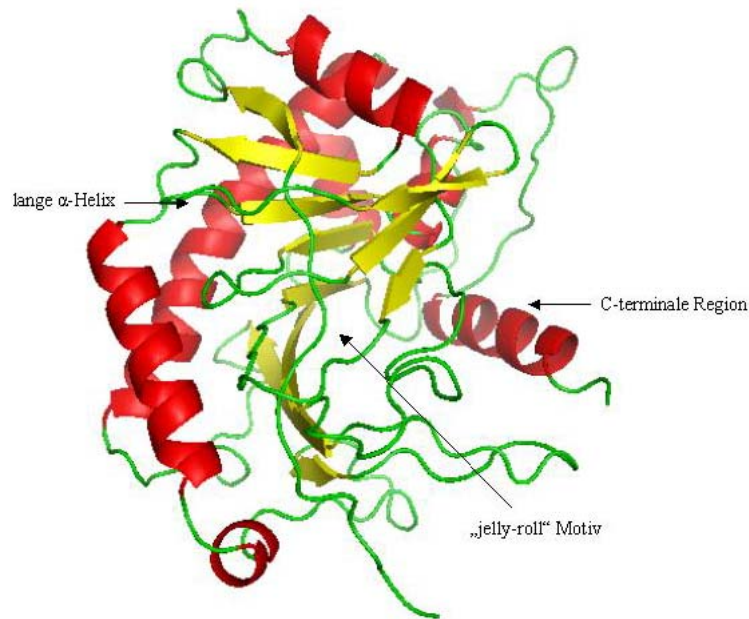


Abb. 48: Homologiemodell von der FLS3 aus *A. thaliana*.

5.6.2 Charakterisierung des aktiven Zentrums von At_FLS1 und At_FLS3

Die Homologiemodelle von At_FLS1 und At_FLS3 zeigten, dass die Eisen-, 2-Oxoglutarat- und Substratbindungsbereiche analog zu der At_ANS angeordnet sind (**Abb. 49 - 51**). Für die Strukturmodelle wurde das DHQ als Substrat verwendet, das das natürliche Substrat für die At_FLS1 und At_FLS3 darstellt.

In At_ANS ist das zweiwertige Eisenion nahezu oktaedrisch mit Aminosäureresten ²³²His, ²⁸⁸His und ²³⁴Asp koordiniert verbunden (H x D ... H-Motiv) sowie durch C1-Carboxyl und C2-Carbonyl des 2-Oxoglutarats. Die sechste Koordinationsstelle wird durch ein Wassermolekül besetzt. Die entsprechende Bindungsstelle wird sowohl in At_FLS1 als auch in At_FLS3 ²⁵¹His, ³⁰⁹His und ²⁵³Asp gebildet. Die Carboxylgruppe am C5 des 2-Oxoglutarats bindet elektrostatisch am Arg in Position 298, bei der At_FLS1 und At_FLS3 in Position 319, und wird zusätzlich über eine Wasserstoffbindung mit Serin in Position 300, bei der At_FLS1 und At_FLS3 in Position 321, stabilisiert (R x S – Motiv).

In At_ANS wird das Substrat durch „ π -stacking“ des A-Ringes mit ³⁰⁴Phe fixiert, was bei der At_FLS1 und At_FLS3 mit ³²⁵Phe ebenfalls zu beobachten ist. Des Weiteren ist eine Wasserstoffbindung zwischen dem Glutamatrest, bei der At_ANS in Position 306, bei der At_FLS1 und At_FLS3 in Position 327, mit der Hydroxylgruppe am C7 des Substrates (A-Ring) nachweisbar. Außerdem ergibt sich eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen ¹⁴⁴Phe, in At_ANS bzw. ¹⁵¹Phe in At_FLS1 und At_FLS3 mit dem B-Ring des Substrates. Die

Hydroxylgruppe am C3' des B-Ringes des Substrates DHQ geht eine Wasserstoffbindung mit dem ^{142}Tyr ein. Bei der At_FLS1 und At_FLS3 ist der Tyrosinrest durch ^{149}His ersetzt. Dieser Austausch sollte aber die Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum nicht beeinflussen und sich somit nicht auf die Aktivität auswirken. Die Orientierung dieses ^{149}His in At_FLS1 ist analog zu ^{142}Tyr in At_ANS, aber überraschenderweise ist der ^{149}His in At_FLS3 leicht verschoben. Diese andere Orientierung des Aminosäurerestes wird sehr wahrscheinlich durch ^{136}Tyr verursacht, während At_FLS1 in dieser Position ein ^{136}Leu kodiert. Der Tyrosinrest ist gegenüber dem Leucinrest aufgrund des Aromaten relativ sperrig und könnte eine Verschiebung des Histidins bewirken. Das wiederum könnte die Aktivität der At_FLS3 hinsichtlich der Substratbindung beeinflussen.

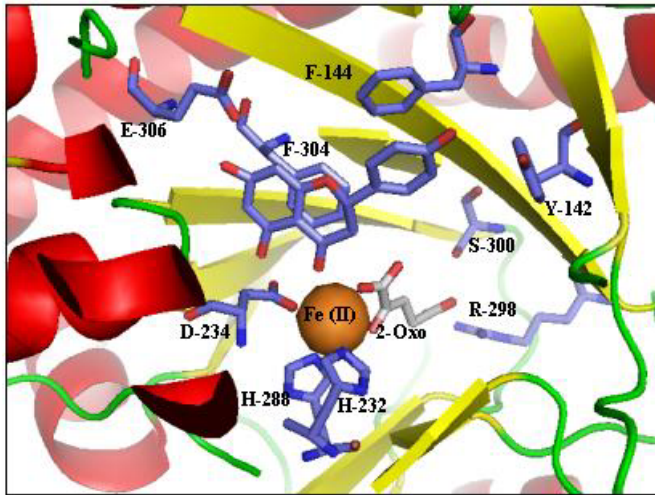


Abb. 49: Aktives Zentrum im Kristall der At_ANS mit NAR als Substrat

Abb. 50: Aktives Zentrum im Homologie-modell der At_FLS1 mit DHQ als Substrat. ^{149}His in At_FLS1 ist analog zu ^{142}Tyr in At_ANS.

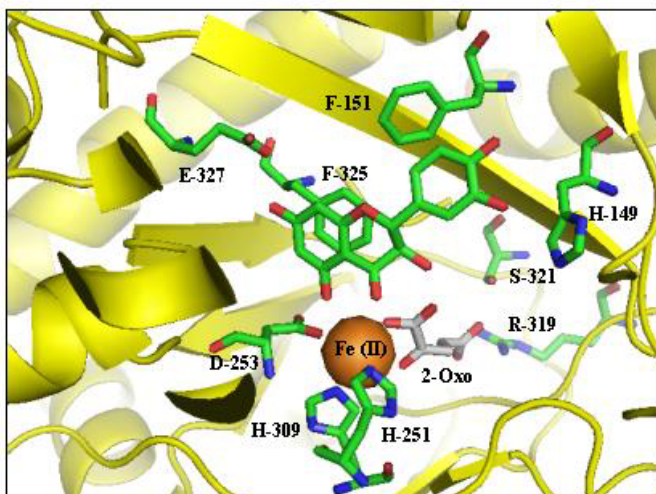
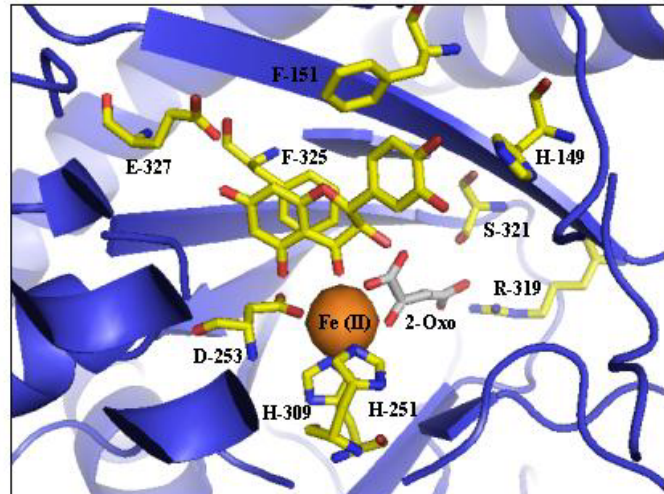


Abb. 51: Aktives Zentrum im Homologie-modell der At_FLS3 mit DHQ als Substrat. Histidin in Position 149 ist im Vergleich zur At_FLS1 anders orientiert, was zur Verschiebung des Substrates und zur Inaktivität des Enzyms führen kann.

Die hohe Strukturähnlichkeit, die aus den Homologiemodellen für At_FLS1, At_FLS3 mit At_ANS abgeleitet werden konnte, führte zur weiteren Untersuchen der At_FLS3 in Bakterienkulturen. Der Verdacht lag nah, dass die Verschiebung von ^{149}His die FLS-Aktivität beeinträchtigen, aber nicht vollständig auslöschen könnte. Deshalb wurden Biotransformationen in Bakterien durchgeführt, die lange Inkubationszeiten bei günstigen Bedingungen für die Enzymaktivität erlauben.

5.7 Biotransformation durch Bakterien mit At_FLS3

Die Biotransformation erfolgte mit induzierten Bakterienzellen und durch Zugabe des entsprechenden Substrates, gelöst in DMSO, in das Medium. Die Bakterienzellen sind in der Lage, das Substrat aufzunehmen, anschließend das Produkt zu bilden und es wieder, zumindest zu einem großen Teil, in das Medium abzugeben. Die Produkte können nach 12 oder mehr Stunden mit Ethylacetat extrahiert und mit Dünnschichtchromatographie oder HPLC analysiert werden, je nachdem wieviel Umsatz in der Zeit stattfindet. Bei den Bakterienzellen erfolgt die Zugabe des Substrates erst vier Stunden nach der Induktion mit Arabinose.

Für die Biotransformationen wurden At_FLS1, At_FLS3 und At_ANS in pDEST14-Konstrukte in *E. coli* verwendet. At_FLS1 und At_ANS dienten nur als Kontrollen.

Anfangs wurden für die Biotransformation 5 mg DHK bzw. DHQ als Substrate eingesetzt und nach etwa 12 Stunden konnte für die At_FLS1 und etwas schwächer für die At_ANS ein Umsatz zu Km bzw. Qu beobachtet (**Abb. 52**) werden. In diesen Versuchen zeigte At_FLS1 mit DHK bzw. DHQ den besten Umsatz. Die FLS-Aktivitäten von At_ANS und At_FLS3 waren viel geringer als die von At_FLS1 (**Abb. 53**). Die At_FLS3 zeigte jedoch nach 12 Stunden keinen Umsatz von DHK oder DHQ zu Km bzw. Qu; erst nach 48 Stunden konnte ein schwacher Umsatz beobachtet werden. Nach Zugabe von 20 mg Substrat (DHK, DHQ) konnte allerdings schon innerhalb von 12 Stunden ein deutlicher Umsatz mit At_FLS3-Transformanten beobachtet werden. Der schwache, aber deutliche Umsatz von DHK oder DHQ zu Km bzw. Qu könnte eine Konsequenz der Verschiebung von ^{149}His in At_FLS3 sein.

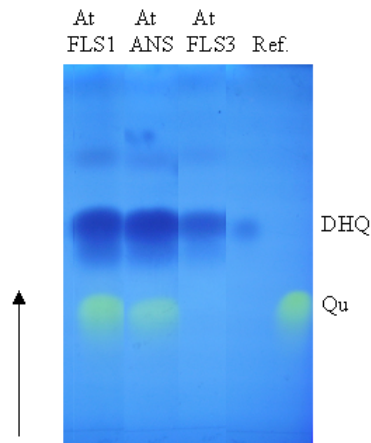


Abb. 52: Nachweis der FLS-Aktivität von Biotransformationen in Bakterien mit At_FLS1, At_ANS und At_FLS3 mit 5 mg DHQ als Substrat nach 12 Stunden. Auftrennung erfolgte durch Cellulose-Dünnschichtchromatographie in CAW, wobei nur At_FLS1 und At_ANS einen Umsatz zu Qu zeigten.

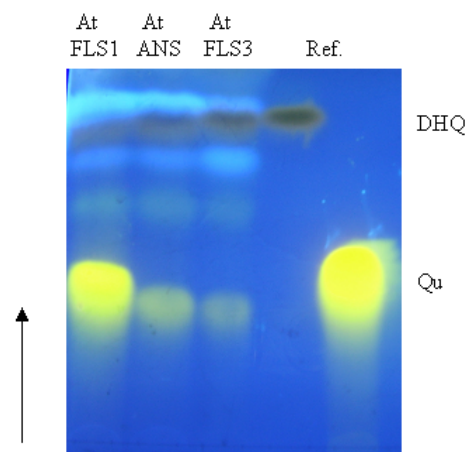


Abb. 53: Nachweis der FLS-Aktivität von Biotransformationen in Bakterien mit At_FLS1, At_ANS und At_FLS3 mit 20 mg DHQ als Substrat nach 48 Stunden. Die Auswertung erfolgte nach Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittel CAW, wobei At_FLS1, At_ANS und At_FLS3 einen Umsatz zu Qu zeigten.

Die Biotransformation wurde zusätzlich zu den Dihydroflavonolen (DHK, DHQ) auch mit Flavanonen (NAR, ERI) als Substrate durchgeführt, wobei eindeutig zu erkennen ist, dass die At_FLS3 ausschließlich Dihydroflavonole als Substrate akzeptiert und zu den entsprechenden Flavonolen Km bzw. Qu umsetzt (**Abb. 54**).

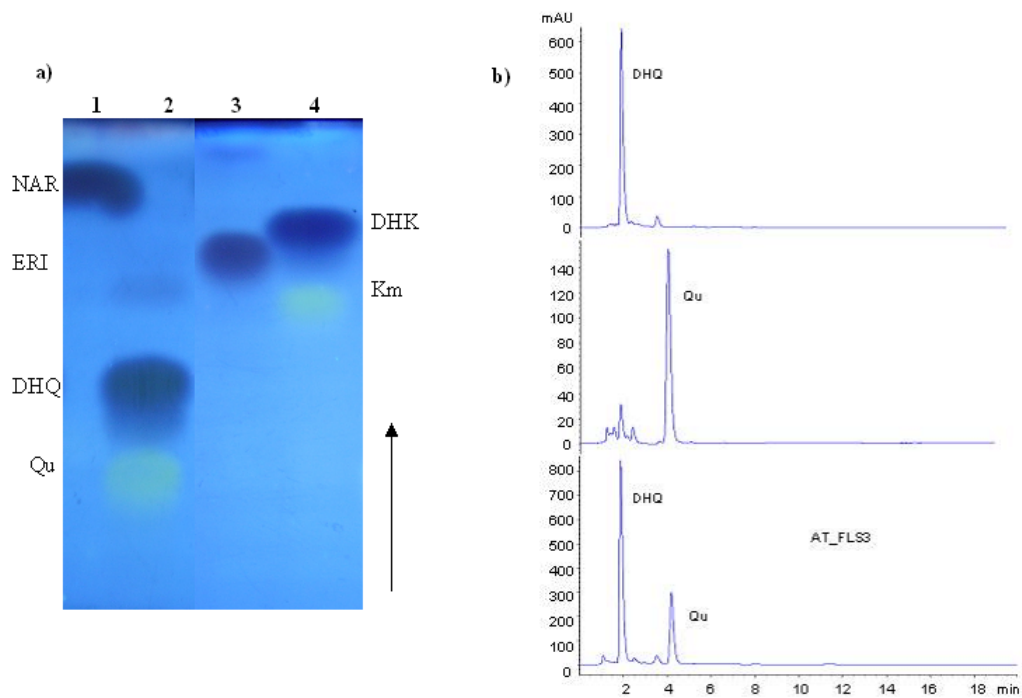


Abb. 54: Nachweis der FLS-Aktivität von Biotransformationen in Bakterien mit At_FLS3 durch Dünnschichtchromatographie in CAW (a) und HPLC (b). a) Nachweis der FLS-Aktivität mit NAR (Spur 1), DHQ (Spur 2), ERI (Spur 3) oder DHK (Spur 4), wobei nur mit DHQ oder DHK einen Umsatz zu Qu bzw. Km beobachtet werden konnte. b) HPLC-Nachweis des Flavonols Qu, als Produkt von DHQ aus der Biotransformation.

Demnach konnte mit Hilfe der Biotransformation eine zweite aktive Flavonolsynthase in *A. thaliana* identifiziert werden, die At_FLS3. Somit könnte die At_FLS3 für die Bildung von Flavonolen in der *ldox/fls1-2m* Mutante verantwortlich sein.

5.8 Herkunft von Flavonolen in *Arabidopsis thaliana*

Durch den Vergleich des Flavonolgehaltes von *Arabidopsis* Wildtyp *Col-0* und den Mutanten *fls1-2m*, *ldox/fls1-2m*, sowie die Untersuchungen der rekombinanten Proteine At_FLS1, 2, 3, 5 und At_ANS konnten die Enzyme, die an der Flavonolsynthese beteiligt sind, identifiziert werden. Demnach sind At_FLS1, At_ANS und At_FLS3 in der Lage, *in situ* die Flavonolbildung zu katalysieren (**Abb. 55**). In dem Wildtyp *Col-0* ist FLS1 vorrangig für die Bildung der Flavonole verantwortlich. In der *fls1-2m* Mutante muss ANS zur Flavonolsynthese beitragen, weil der Flavonolgehalt in *ldox/fls1-2m* Mutante deutlich absinkt. Das in der Doppelmutante noch nachweisbare Flavonol erfordert eine weitere FLS-Aktivität, die nach den Ergebnissen der Biotransformation At_FLS3 zugeschrieben werden kann. Das endgültige Ergebnis würde eine Dreifachmutante aus FLS1, ANS und FLS3 liefern.

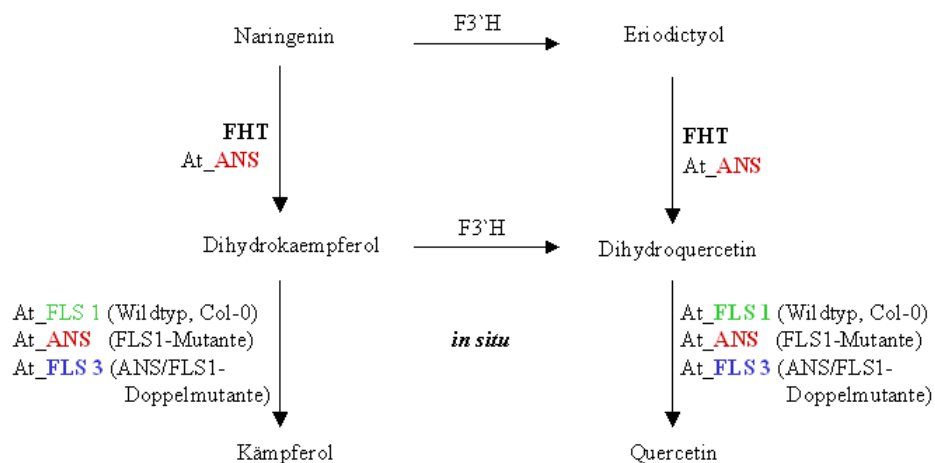


Abb. 55: Wege zu Flavonolen in *Arabidopsis thaliana*.

5.9 Flavonoide in *Fragaria x ananassa*

In diesen Teil der Arbeit wurden die PA-Biosynthese und die daran beteiligten Enzyme in *F. x ananassa* näher untersucht. Ziel der Untersuchungen war es, mögliche klimatische, geographische und entwicklungsbedingte Auswirkungen auf die enzymatischen Aktivitäten in den Früchten zu bestimmen. Die Analyse erfolgte in fünf Entwicklungsstadien der Erdbeerfrüchte. Für die biochemische Untersuchung der Erdbeerfrüchte wurden sechs Genotypen verwendet: „Camarosa“, „Candonga“, „sel. 99.163.14“, „sel. 99.20.01“, „Quenn Elisa“ und „Onda“. Alle sechs Genotypen wurden im Norden (Cesena) und nur vier Genotypen („Camarosa“, „Candonga“, „sel. 99.163.14“ und „sel. 99.20.01“) im Süden (Metaponto) Italiens angebaut. „Quenn Elisa“ und „Onda“ wurden aufgrund der benötigten Wachstumsbedingungen nur im Norden angebaut (Carbone et al., 2009). Zusätzlich wurden auch die heterolog exprimierten Proteine, Fa_FHT, Fa_FLS, Fa_DFR, Fa_ANS, Fa_LAR, Fa_ANR und Fa_FGT biochemisch untersucht.

In reifen Früchten (Methanol-Extrakt) konnten vier Klassen von phenolischen Verbindungen nachgewiesen werden. Die Anthocyane bilden die mengenmäßig größte Gruppe mit einer Konzentration von 180 mg/kg⁻¹ Fruchtfleisch (Almeida et al., 2007). Das Pg-3-*O*-Glukosid ist das Hauptanthocyan in den Früchten mit bis zu 80%. Die Anthocyane kommen vor allem als Mono- (Glucose, Arabinose) und Disaccharide (Rutinose) oder als Malonylglykoside vor. Flavonole und Flavan-3-ole/PA's als weitere Vertreter der phenolischen Verbindungen sind mit einer Konzentration von 23 und 36 mg/kg⁻¹ Fruchtfleisch enthalten. Die Flavonole Km und Qu kommen im Verhältnis 2:3 vor, vor allem als 3-*O*-Glukoside und 3-*O*-Glucuronide. Bei den Flavan-3-olen ist Cat der Hauptvertreter in den Früchten, Epicat kommt dagegen nur in geringen Spuren vor, wobei das Cat als Terminaleinheit und Epicat als Verlängerungseinheit für die Bildung der PA's dienen.

5.10 Expression von Enzymen der Flavonoidbiosynthese aus *Fragaria x ananassa* in Hefen und Bakterien

Ausgewählte Enzyme der Flavonoidbiosynthese wurden zunächst rekombinant hergestellt und charakterisiert. Dazu wurden die cDNAs von Fa_FHT, FLS, DFR, ANS, LAR, ANR und FGT in *E. coli* und *S. cerevisiae* in den Vektoren pET15b (Fa_FGT) und pYES2 (alle anderen Proteine) exprimiert (4.12.10 und 4.12.7).

Alle rekombinanten Enzyme zeigten Aktivität, wobei überraschenderweise Fa_FHT (Abb. 56), Fa_FLS (Abb. 57), Fa_DFR (Abb. 58) und Fa_ANS (Abb. 59) die 4'-hydroxylierten Flavonoide (NAR, DHK und Lpg) gegenüber den entsprechenden 3', 4'-hydroxylierten Flavonoiden (ERI, DHQ und Lcy) (Tab. 4) bevorzugten. Dagegen wurden für Fa_LAR (Abb. 60) und Fa_ANR (Abb. 61) höhere Aktivitäten mit den 3', 4'-hydroxylierten Flavonoiden (Lcy und Cy) gemessen (Tab. 4). Zusätzlich wurde bei der Fa_LAR beobachtet, dass nur das 3', 4'-hydroxylierte Lcy als Substrat akzeptiert und zum entsprechenden Flavan-3-ol Cat umgesetzt wurde (Abb. 60). Bei der Fa_FGT (Abb. 62) wurde eine strenge 3-O-Glucosyltransferaseaktivität beobachtet, wobei mit Pg und Cy annähernd gleich viel Pg- bzw. Cy-3-O-Glukosid gebildet wurden (Tab. 4). Die Flavonole dagegen wurden als Substrate für die Glykosylierung weniger bevorzugt.

Fa_FHT

Die rekombinante Fa_FHT (Almeida et al., 2007) zeigte in *in vitro* Tests keine enge Substratspezifität, bevorzugte aber NAR (Abb. 56), was zuvor schon für die rekombinante FHT aus *A. thaliana* (Prescott et al., 2002; Owens et al., 2008), *M. domestica* (Halbwirth et al., 2006), *P. hybrida* (Britsch & Grisebach, 1986; Lukačín et al., 2000) und *C. sinensis* (Punyasiri et al., 2004) gezeigt worden war (Abb. 56). Außerdem setzten die FHTs *in vitro* das Racemat (2S/2R)-NAR nicht vollständig um, bedingt durch die Stereospezifität für (2S)-NAR. FHTs aus *G. max* und *Oryza sativa* dagegen bevorzugten eher ERI gegenüber NAR als Substrat, aber auch Homoeriodictyol und Hesperitin (Kim et al., 2008a, b) bei gleicher Spezifität für die S-Enantiomeren. Da die FHT zu den 2-ODD's gehört, ist für die Enzymaktivität die Zugabe von 2-Oxoglutarat und Eisen (II)-Ionen notwendig, eventuell auch von Ascorbat. Britsch & Grisebach (1986) untersuchten die Abhängigkeit von diesen Kofaktoren am Beispiel der *Petunia* FHT. Oxalacetat, 2-Oxopentanoat, Acetondicarboxylat oder Pyruvat konnten das 2-Oxoglutarat nicht ersetzen. Jedoch kann z.B. das Kobalt (II)-Ion das Eisen (II)-Ion ersetzen, wohingegen Kupfer (II)-Ion die Reaktion hemmt.

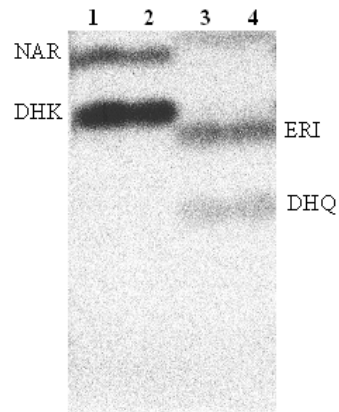


Abb. 56: Nachweis der Aktivität von rekombinanter Fa_FHT. Die ^{14}C -markierten Flavanone NAR und ERI wurden mit Fa_FHT inkubiert, die Produkte anschließend mit EtOAc extrahiert und die Extrakte auf Cellulose-DC in CAW aufgetrennt. Fa_FHT setzt NAR (Spur 1-2) zu DHK und ERI (Spur 3-4) zu DHQ um.

Fa_FLS

Die rekombinante Fa_FLS (Almeida et al., 2007) zeigte eine höhere Aktivität mit DHK als Substrat als mit dem DHQ (Abb. 57) (Prescott et al., 2002; Owens et al., 2008; Preuss et al., 2009), was zuvor auch für die FLS aus *A. thaliana* und *C. unshiu* beobachtet worden war (Lukačín et al., 2003).

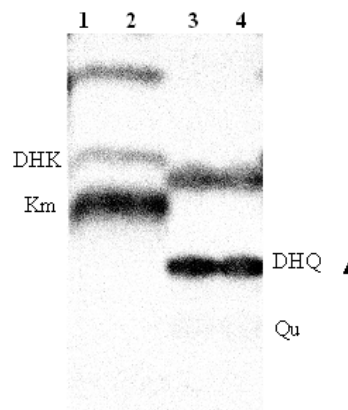


Abb. 57: Nachweis der Aktivität von rekombinanter Fa_FLS. Die ^{14}C -markierten Substrate und Produkte wurden nach der Inkubation mit EtOAc extrahiert und auf Cellulose-Dünnschicht in CAW getrennt. Die Fa_FLS zeigt einen Umsatz von DHK (Spur 1-2) zu Km oder DHQ (Spur 3-4) zu Qu.

Fa_DFR

Die DFR aus *F. x ananassa* (**Abb. 58**) (Almeida et al., 2007) bevorzugt das DHK gegenüber DHQ als Substrat, wie schon für die DFRs aus *L. japonicus* (Shimada et al., 2005) und *M. truncatula* (Xie et al., 2004) gezeigt. Dagegen zeigt die rekombinante DFR aus *V. vinifera* (Petit et al., 2007) eher eine Bevorzugung von DHQ gegenüber DHK. Diese unterschiedlichen Substratspezifitäten konnten anhand der 3D-Struktur (Homologiemodell) abgeleitet werden, wobei ein 26 Aminosäure-Fragment (Position 133-156) identifiziert wurde, welches für die Substratspezifität verantwortlich ist. Schon allein der Austausch von ^{134}Asp kann diese Unterschiede in der Substratbevorzugung hervorrufen (Petit et al., 2007). Diese Vermutung wurde durch eine *Gerbera* Mutante bestätigt, in der das ^{134}Asp durch Leu ausgetauscht wurde. In dieser Mutante wurde anschließend kein Cyanidin mehr gebildet (Petit et al., 2007). In einer *Vitis* Mutante, wo das ^{134}Asp durch das Asn ersetzt wurde, konnte nur noch ein geringer Umsatz von DHQ oder DHK zu Lcy bzw. Lpg festgestellt werden. Das heißt die Substrate konnten im aktiven Zentrum nicht mehr so gut gebunden werden und zeigten dadurch eine geringere Aktivität. Im Allgemeinen kann daraus gefolgert werden, dass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem B-Ring des Substrates und den darumliegenden Aminosäuren die Affinität und die katalytische Aktivität der DFRs im aktiven Zentrum beeinflussen.

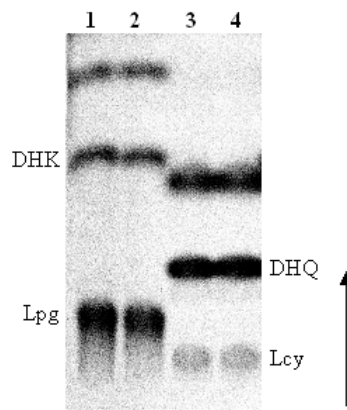


Abb. 58: Nachweis der Aktivität von rekombinanter *Fa_DFR*. Die ^{14}C -markierten Substrate DHK oder DHQ wurden mit *Fa_DFR* und NADPH inkubiert, anschließend mit EtOAc extrahiert und auf Cellulose-Dünnschicht in CAW aufgetrennt. *Fa_DFR* setzt DHK (Spur 1-2) zu Lpg und DHQ (Spur 3-4) zu Lcy um.

Fa_ANS

In vitro Tests mit rekombinanter *Fa_ANS* zeigten, dass Lpg und Lcy als Substrate akzeptiert werden und zu Pg bzw. Cy umgesetzt, aber Lpg gegenüber Lcy bevorzugt (**Abb. 59**). Das wiederum spiegelt die Ergebnisse der chemischen Analyse von den Früchten von *F. x ananassa* wieder (Carbone et al., 2009). Die rekombinante *At_ANS* zeigte dagegen eine höhere Aktivität mit Lcy als mit Lpg (Preuss et al., 2009).

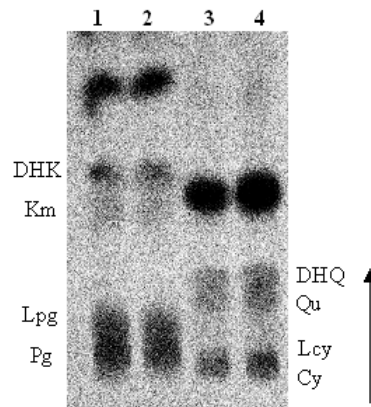


Abb. 59: Nachweis der Aktivität von rekombinanter *Fa_ANS* mit ^{14}C -markierten Lpg oder Lcy als Substrate. Die Auswertung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie in CAW. *Fa_ANS* setzt Lpg (Spur 1-2) zu Pg und Lcy (Spur 3-4) zu Cy um. Außerdem zeigt die *Fa_ANS* eine Seitenreaktion, in dem sie das restliche DHK (Spur 1-2) und DHQ (Spur 3-4), aus der Synthese von den Leucoanthocyanidinen, zu Km und Qu umsetzt (FLS-like-Reaktion).

Fa_LAR

Fa_LAR zeigte Spezifität für Lcy (3', 4'-hydroxyliert), das zu Cat umgesetzt wurde (**Abb. 60**) und als Erweiterungseinheit an der Polymerisierung zu PA's beteiligt ist. Dagegen akzeptiert die rekombinate LAR aus *V. vinifera* Lcy, Lpg und Leucodelphinidin als Substrat (Pfeiffer et al., 2006). Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass in *V. vinifera* auch Delphinidinderivate vorkommen, wie Malvidin-3-*O*-Glukoside und Epigallocatechin (Jeong et al., 2006).

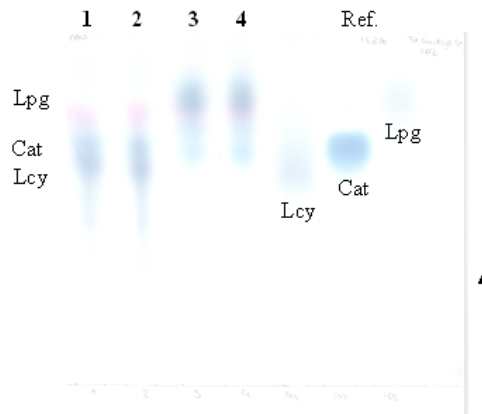


Abb. 60: Nachweis der Aktivität von rekombinanter Fa_LAR. Die unmarkierten Leucoanthocyanidine Lpg und Lcy wurden mit NADPH inkubiert, mit EtOAc extrahiert und auf Cellulose Dünnschicht in BAW aufgetrennt. Fa_LAR setzt nur 3',4'-hydroxylierte Lcy (Spur 1-2) zu Cat um.

Fa_ANR

Die heterolog exprimierte Fa_ANR akzeptierte sowohl Pg als auch Cy als Substrate (Almeida et al., 2007) und setzte diese zu den entsprechenden Flavan-3-olen Epiafzelechin und Epicat um, wobei das Cy als Substrat bevorzugt wurde (Abb. 61). Die rekombinante ANR aus *V. vinifera* hingegen setzt Pg, Cy und Delphinidin zum Epiafzelechin, Epicat und Epigallocatechin um (Pfeiffer et al., 2006). Die ANR aus *M. truncatula* bevorzugte Cy vor Pg und Delphinidin als Substrate und die ANR aus *A. thaliana* eher Pg gegenüber Cy (Xie et al., 2004).

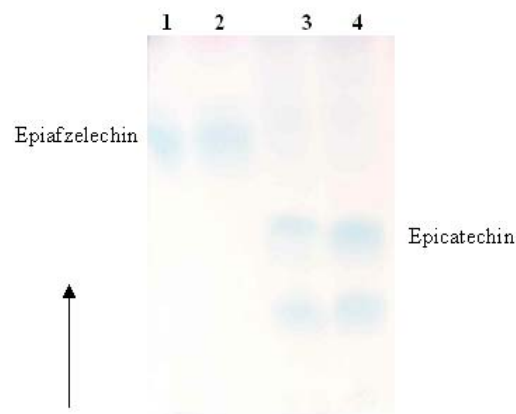


Abb. 61: Nachweis der Aktivität von rekombinanter Fa_ANR mit unmarkierten Pg oder Cy als Substrate und NADPH. Die Auswertung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Cellulose in BAW und DMAZA, wobei nur die Produkte angefärbt wurden. Fa_ANR setzt Pg (Spur 1-2) zu Epicat und Cy (Spur 3-4) zu Epiafzelechin um.

Fa_FGT

Die FGT aus *F. x ananassa* glykosyliert das C3-Hydroxyl der Anthocyanidine Pg und Cy mit fast gleicher Effizienz (**Abb. 62**). In sehr geringen Mengen wurden auch die Flavonole Km und Qu glykosyliert. Die meisten bislang charakterisierten Glykosyltransferasen können verschiedene Hydroxyle an Flavonoiden glykosylieren, so zum Beispiel in Position 3, 5, 7 oder 4'. In *F. x ananassa* wird Qu in 3 oder 7 glykosyliert (Qu-3/7-*O*-Glukosid). Das Gleiche gilt für Km. Außerdem konnten 3, 7-*O*-Diglukoside von Km und Qu nachgewiesen werden (Cheng et al., 1993). Die heterolog exprimierte FGT (GT1) aus *A. thaliana* zeigte geringe Substratspezifität und glykosylierte NAR (Position 7), ERI (7), Ap (7), Lu (7), Km (3), Qu (3), Isorhamnetin (3) und Cy (3). Flavonole wurden gegenüber Flavanonen und Flavonen bevorzugt (Yamazaki et al., 2002).

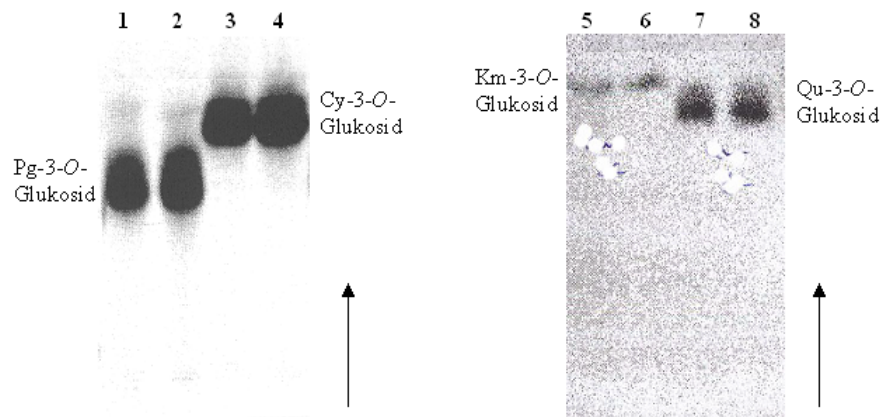


Abb. 62: Nachweis der Aktivität der rekombinanten *Fa_FGT*. Die Substrate Pg, Cy, Km oder Qu wurden mit UDP-[U-¹⁴C]-Glucose inkubiert, nach der Inkubation mit Isoamylalkohol (Pg, Cy) oder EtOAc (Km, Qu) extrahiert und auf Cellulose-Dünnschicht in Forestal aufgetrennt. Die *Fa_FGT* setzt Pg (Spur 1-2) zu Pg-3-*O*-Glukosid, Cy (Spur 3-4) zu Cy-3-*O*-Glukosid, Km (Spur 5-6) zu Km-3-*O*-Glukosid und Qu (Spur 7-8) zu Qu-3-*O*-Glukosid um.

Tab. 3: Aktivitäten und Substratspezifität rekombinanter Enzyme aus *F. x ananassa*.

Die relative Aktivität der einzelnen Enzyme wurde mit deren entsprechenden physiologischen Substraten gemessen. Der Umsatz vom bevorzugten Substrat wurde gleich 100% gesetzt.

Enzym	Substrat	Relative Aktivität [%]	Produkte
Fa_FHT	Naringenin	100	Dihydrokämpferol
	Eriodictyol	67	Dihydroquercetin
Fa_FLS	Dihydrokämpferol	100	Kämpferol
	Dihydroquercetin	2,5	Quercetin
Fa_DFR	Dihydrokämpferol	100	Leucopelargonidin
	Dihydroquercetin	43	Leucocyanidin
Fa_ANS	Leucopelargonidin	100	Pelargonidin
	Leucocyanidin	37	Cyanidin
Fa_LAR	Leucopelargonidin	0	Afzelechin
	Leucocyanidin	100	Catechin
Fa_ANR	Pelargonidin	24	Epiafzelechin
	Cyanidin	100	Epicatecchin
Fa_FGT	Pelargonidin	100	Pelargonidin-3- <i>O</i> -Glukosid
	Cyanidin	83	Cyanidin-3- <i>O</i> -Glukosid
	Kämpferol	3	Kämpferol-3- <i>O</i> -Glukosid
	Quercetin	8	Quercetin-3- <i>O</i> -Glukosid

Wenn die Metabolite und Aktivitäten der rekombinanten Enzyme aus *F. x ananassa* näher betrachtet werden, fällt auf, dass die Flavonole Km und Qu im Verhältnis 2:3 stehen. Die rekombinante Fa_FHT und Fa_DFR aber bevorzugen eher das 4'-hydroxylierte NAR und DHK. Die Fa_LAR dagegen zeigt *in vitro* nur Aktivität mit 3',4'-hydroxylierten Lcy. Die Bevorzugung der Fa_DFR von DHK gegenüber DHQ ist wichtig für die Bildung von Pelargonidinderivaten (Pg-3-O-Glukoside), welche in den Erdbeerfrüchten als Hauptflavonoide vorkommen (Pg-3-O-Glukosid-Gehalt von 80%). Auf der anderen Seite ist die Bildung von Lcy über das DHQ durch die DFR Voraussetzung für die Synthese der 3',4'-hydroxylierten Flavan-3-ole (z.B. Cat) durch die LAR und diese wiederum wichtig für die Polymerisierung der Flavan-3-ole zu den PA's (Dixon et al., 2004; Xie et al., 2005).

Das lässt daraufschließen, dass die F3'H für die 3',4'-hydroxylierten Flavonoide in den Früchten verantwortlich sein kann, jedoch noch nicht aus *F. x ananassa* isoliert und dementsprechend untersucht werden konnte. Deshalb kann vermutet werden, dass die F3'H auf Ebene der Dihydroflavonole (DHK zu DHQ) oder Leucoanthocyanidine (Lpg zu Lcy) Aktivität aufweist (Ueyama et al., 2002; Jeong et al., 2006; Xu et al., 2007). Zum Beispiel konnten bei den rekombinanten F3'H aus *A. thaliana* (Schoenbohm et al., 2000) und *P. hybrida* (Brugliera et al., 1999) in Hefen eine Aktivität mit NAR zu ERI beobachtet werden. Dagegen weist die rekombinante F3'H aus *Torenia hybrida* (Asteraceae) eine geringe Substratspezifität auf und setzt NAR zu ERI, DHK zu DHQ, Km zu Qu und Ap zu Lu um. Diese gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass die F3'H aus *F. x ananassa* das Verhältnis von Km und Qu in den Früchten beeinflussen kann, entweder auf der Ebene der Dihydroflavonole (DHK) oder Flavonole (Km). Des Weiteren wäre interessant, ob die F3'H auch für die Hydroxylierung auf Seiten der Leucoanthocyanidine (Lpg zu Lcy) verantwortlich ist. Dadurch können die Substrate für die LAR-Reaktion zur Verfügung gestellt werden, woraus Cat gebildet werden kann.

5.11 Nachweis der Enzymaktivität in Früchten von *Fragaria x ananassa*

Die Expression und Aktivitäten relevanter Enzyme sowie die Profile der Flavonoidmetabolite wurden in verschiedenen Wachstumsstadien der Früchte von *F. x ananassa* untersucht (Genexpression: Fabrizio Carbone, ENEA, Trisaia Research Center Italien; Metabolite: Ric de Vos, Plant Research International Niederlande). Das Ziel dieser Untersuchungen war die von Umwelteinflüssen, wie Temperatur oder Licht und Standort, abhängige Fruchtqualität.

Aufgrund ihres Anthocyan- (Pg-3-*O*-Glukosid) und Flavan-3-olgehaltes (Cat) in den Früchten können die Genotypen unterteilt werden. „Candonga“ z.B. enthält viele Anthocyane, die „sel. 99.163.14“ dagegen viele Flavan-3-ole. „Camarosa“ und „sel. 99.20.01“ nehmen eine Mittelstellung ein. Die Genotypen „Onda“ und „Queen Elisa“ enthalten im Allgemeinen weniger Flavonoide und demnach auch weniger Anthocyane und Flavan-3-ole als die anderen Genotypen (Carbone et al., 2009).

Die Aktivitäten der Enzyme CHS/CHI, FHT, DFR, LAR, ANR und FGT in den Früchten aus fünf Wachstumsstadien (G1-R) wurden mit Hilfe der Dellus-Aufarbeitung (4.10.3) und mit Standardenzymtests (4.10.4) untersucht. Von allen Enzymen außer ANR konnten Aktivitäten in allen fünf Wachstumsstadien gemessen werden. Während die CHS/CHI, FHT und FGT starke Aktivitäten zeigten, war die ANR nur in den ersten drei Stadien (G1-W), jedoch nicht in T und R aktiv. Außerdem zeigten die DFR, LAR und auch die ANR im Allgemeinen sehr geringe Aktivitäten, was auf den Gehalt an Flavan-3-olen (Cat, Epicat) während der Fruchtentwicklung bzw. Reifung zurückgeführt werden könnte (Almeida et al., 2007). FLS-, ANS- und F3'H-Aktivitäten konnten in den Früchten nicht beobachtet werden. Die fehlende Aktivität der FLS könnte durch die geringe Menge an Flavonolen in den Früchten erklärt werden. Aber auch andere Verbindungen (Polysaccharide, niedermolekulare Verbindungen, Salze) im Rohextrakt könnten die Aktivität beeinflussen. In Studien mit dem *F. x ananassa* Genotyp „Elsanta“ konnte dagegen die FLS im Rohextrakt nachgewiesen werden, zwar nicht im frühen Stadium, aber die FLS-Aktivität stieg in Richtung Fruchtreife an (Halbwirth et al., 2006). Die ANS konnte bisher noch nie aus einem Pflanzenextrakt nachgewiesen werden, was auch bei den Erdbeerfrüchten der Fall war. Obwohl die rekombinante ANS aus *F. x ananassa* die Substrate Lpg oder Lcy zu Pg bzw. Cy umsetzt. Hierfür könnte die Instabilität der ANS beitragen, was bei der Aufreinigung von 2-ODD's beobachtet werden konnte (Lukačin et al., 2002). Die F3'H dagegen gehört zu den Cytochrom P450 Monooxygenasen. Proteine dieser

Klasse konnten bislang noch nicht mit der Dellus-Aufarbeitung nachgewiesen werden. Auch mit Hilfe einer Mikrosomenpräparation zeigte die F3'H keine Aktivität. Hier könnten auch niedermolekulare Verbindungen (Salze) die Aktivität beeinflussen, so dass kein Nachweis mehr möglich ist. Wohingegen in Petersilienzellkulturen (Hagmann et al., 1983), *Citrus x aurantium* (Rutaceae) Zellkulturen (Doostdar et al., 1995) und im Maisgewebe (Larson et al., 1986) F3'H-Aktivität gezeigt werden konnte. Dabei wurde NAR zu ERI, Ap zu Lu und DHK zu DHQ umgesetzt (Ueyama et al., 2002). Auch in *V. vinifera* konnte beobachtet werden, dass die F3'H an der Biosynthese von Flavonolen (Qu) und Flavan-3-olen (Cat, Epicat) beteiligt ist (Jeong et al., 2006).

Die Aktivität der CHS/CHI konnte im Rohextrakt der Erdbeerfrüchte mit [2-¹⁴C]-Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA nachgewiesen werden (**Abb. 62**). Durch die Anwesenheit der FHT wurde das Produkt NAR zu DHK umgesetzt (**Abb. 62**). Die DFR konnte im Rohextrakt DHK zu Lpg umsetzen (**Abb. 62**). Der Nachweis der FGT-Aktivität erfolgte im Rohextrakt mit Cy und UDP-[U-¹⁴C]-Glucose, wodurch Cy-3-O-Glukosid gebildet wurde (**Abb. 62**). Alle Standardenzymtests erfolgten in einer zweifachen Wiederholung, um die Fehler möglichst gering zu halten.

Die Abbildung 62 zeigt ein Beispiel für den Nachweis der Aktivitäten von CHS/CHI, FHT, DFR und FGT mit ¹⁴C-markierten Substraten.

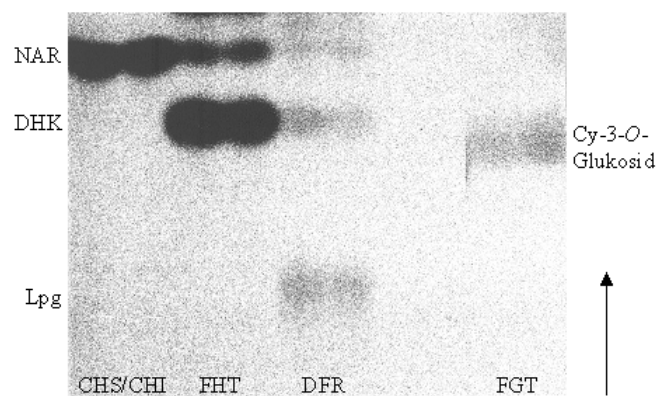


Abb. 62: Nachweis der Aktivitäten von CHS/CHI, FHT, DFR und FGT im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten der Sorte „Queen Elisa“ (G1-Stadium). Die ¹⁴C-markierten und unmarkierten Substrate Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA (CHS/CHI), NAR (FHT), DHK (DFR) oder UDP-Glucose und Cy (FGT) wurden mit dem Rohextrakt inkubiert, anschließend extrahiert und auf Cellulose-Dünnschichtplatten in CAW aufgetrennt. CHS/CHI setzen Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA zu NAR, FHT setzt NAR zu DHK, DFR setzt DHK zu Lpg und FGT setzt UDP-Glucose und Cy zu Cy-3-O-Glukosid um.

Die LAR-Aktivität im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten wurde mit Lcy als Substrat gemessen, wobei Cat gebildet worden war. Cat wurde durch Dünnschichtchromatographie auf Cellulose und DMAZA –Sprühreagenz (Dimethylzimtaldehyd) sowie über HPLC nachgewiesen (**Abb. 63**).

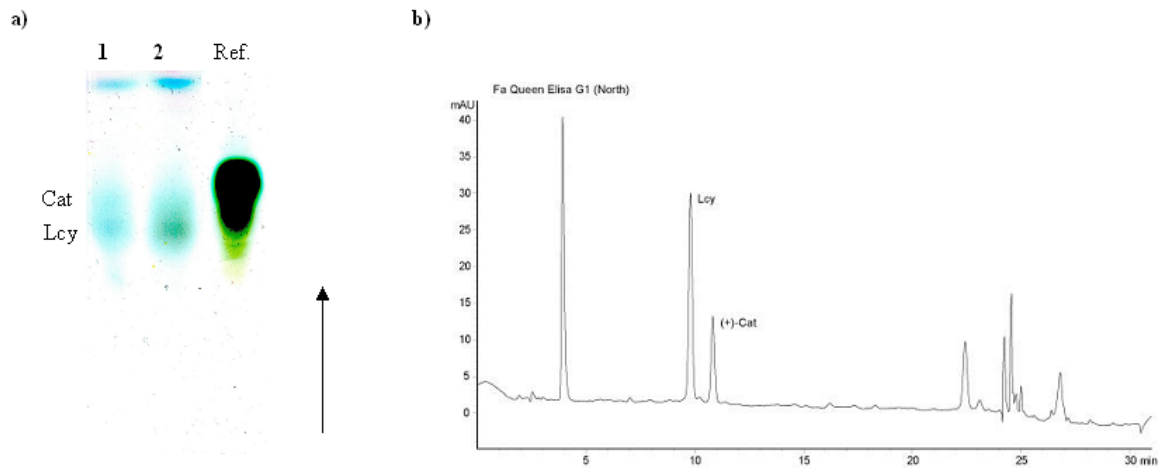


Abb. 63: Nachweis der LAR-Aktivität im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten der Erdbeersorte „Queen Elisa“ (G1-Stadium) mit Lcy als Substrat, wodurch Cat gebildet wird über Dünnschichtchromatographie (a) und HPLC (b). a) Die Auswertung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Cellulose in BAW mit anschließender Derivatisierung durch DMAZA b) HPLC-Nachweis von der LAR-Aktivität mit Lcy zu Cat.

ANR-Aktivität wurde durch den Umsatz von Cy zu Epicat nachgewiesen (**Abb. 64**). Nach chromatographischer Trennung und Detektion mit dem Sprühreagenz DMAZA konnte die Bildung von Epicat im Rohextrakt beobachtet werden.

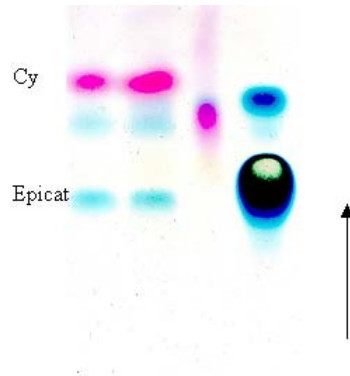


Abb. 64: Nachweis der ANR-Aktivität im Rohextrakt der Erdbeersorte „Queen Elisa“ (G1-Stadium). Die Inkubation erfolgte mit Cy als Substrat und NADPH zu Epicat. Die Auswertung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Cellulose in BAW und anschließender Derivatisierung mit DMAZA.

Beim Vergleich von Aktivitäten und Transkripten mit Hilfe der Box Plot-Auftragung, konnten Korrelationen zwischen den Enzymen und Genen beobachtet werden (Carbone et al., 2009). Somit folgen die Enzyme und Gene der Flavonoidbiosynthese in den Früchten einem bestimmten Entwicklungsmuster. Daraus ergibt sich eine entwicklungsabhängige Regulation des gesamten Flavonoidstoffwechsels. Flavan-3-ole werden z. B. in den frühen (G1-W) Stadien vermehrt gebildet und akkumuliert als in den späteren (T-R) Wachstumsstadien (Almeida et al., 2007; Carbone et al., 2009), um die Früchte während des Wachstums vor Fraßschutz durch Insekten und Pflanzenschädlingen, zu schützen (Gould & Lister, 2006). Die Anthocyanbildung dagegen beginnt erst im T-Stadium, das ist wiederum wichtig für die visuelle Attraktivität auf Vögel (Carbone et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien mit *V. vinifera* (Boss et al., 2005), *V. myrtillus* (Jaakola et al., 2002) und *F. x. ananassa* vs Elsanta (Halbwirth et al., 2006). Außerdem konnten in Hinblick auf die Genexpression der Flavonoidgene in den Früchten verschiedene Muster beobachtet werden: (1) Zwei-Phasen-Muster: die *CHS*, *CHI*, *FHT*, *LAR* und *ANS* Gene zeigten einen Transkriptionspeak im G1-Stadium und einen zweiten im T/R-Stadium, wobei der erste Peak kleiner war als der zweite (Manning, 1998; Halbwirth et al., 2006; Almeida et al., 2007). (2) Ein-Phasen-Muster: die *DFR* und *FGT* Gene wurden bis zum T/R-Stadium hochreguliert

(Manning, 1998; Halbwirth et al., 2006; Almeida et al., 2007). (3) Ein-Phasen-Muster: bei den Genen *F3'H*, *FLS* und *ANR* nimmt der Transkriptionslevel in Richtung R-Stadium ab, das wiederum könnte die fehlende Aktivität der ANR in den T- und R-Stadien der Früchte erklären (Carbone et al., 2009).

5.11.1 Aktivitätsprofile von Enzymen der Flavonoidbiosynthese in *F. x ananassa*

Probleme beim Vergleich von Transkripten und Aktivitäten könnten sich dadurch ergeben, dass die Flavonoidgene in den meisten Pflanzen in mehreren Kopien vorliegen (Multigen-Familien). Genexpressionsstudien und die EST-Genbank ergaben, dass für die *CHS* vier Sequenzen vorliegen (*CHS1*, 2, 3 und 5) (Almeida et al., 2007; Carbone et al., 2009), bei Southernblot Analysen des Genotyps „Queen Elisa“ konnten für die *FHT*, *DFR* und *LAR* jeweils vier Kopien und für die *FGT* nur eine Kopie beobachtet werden (Almeida et al., 2007; Carbone et al., 2009).

Für die enzymatischen Tests in dieser Arbeit wurden die Substrate verwendet, die bei den *in vitro* Standardenzymtests mit den rekombinanten Enzymen (5.10) die optimale Aktivität besaßen (Almeida et al., 2007). Probleme könnten beim Nachweis der Enzymaktivität im Rohextrakt (Gesamtprotein) auftreten. Southernblot Analysen ergaben, dass Enzyme in Multigen-Familien (Isoformen) vorkommen. Diese Isoformen könnten einer anderen Regulation folgen, andere Substratspezifität aufweisen oder in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Owens et al., 2008). Das kann die Ergebnisse der Enzymtests hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität bzw. Substratspezifität im Rohextrakten aus Erdbeerfrüchten beeinflussen. Zusätzlich könnten sich auch mögliche Seitenreaktionen einzelner Enzyme (*FLS* oder *ANS*) auf die gemessene Enzymaktivität auswirken.

CHS

Die spezifischen Aktivitäten verglichen mit dem Genexpressionsmuster (Zwei-Phasen-Muster), wobei der erste Transkriptionspeak im G1-Stadium und ein zweiter Peak im T/R-Stadium auftritt, korreliert mit den der Enzymaktivitäten in den sechs Genotypen, wobei die Transkription im T/R-Stadium am höchsten ist (Carbone et al., 2009). Sowohl die Genotypen aus dem Süden (Abb. 65) und Norden (Abb. 66), zeigten das gleiche Aktivitätsmuster. Fast alle zeigten im G1-Stadium ein Maximum der CHS-

Aktivität. Danach sank die Aktivität bis zum W-Stadium ab und stieg dann wieder zum T/R-Stadium an, wo auch die höchste Aktivität erreicht wurde. Die Genotypen „Camarosa“ und „sel. 99.20.01“ zeigten aber schon im T-Stadium ihre höchste CHS-Aktivität. Eine weitere Ausnahme stellten die Genotypen „Queen Elisa“ und „Onda“ (Norden) dar, hier zeigte die CHS-Aktivität ihren Höhepunkt im G1-Stadium, fiel dann bis zum W-Stadium ab und blieb bis zum R-Stadium konstant. Das könnte damit zu erklären sein, dass die „Queen Elisa“ und „Onda“ im Allgemeinen weniger Flavonoide in den Früchten bilden bzw. enthalten. Dadurch fiel die CHS-Aktivität auch geringer aus gegenüber den anderen Genotypen.

Zumal die CHS in *F. x ananassa* eine Multigen-Familien bildet (CHS1, 2, 3 und 5), konnte doch annähernd das gleiche Muster wie bei der Genexpression erhalten werden. Unterschiede könnten die unterschiedlichen Isoformen liefern aufgrund ihrer Substratspezifität.

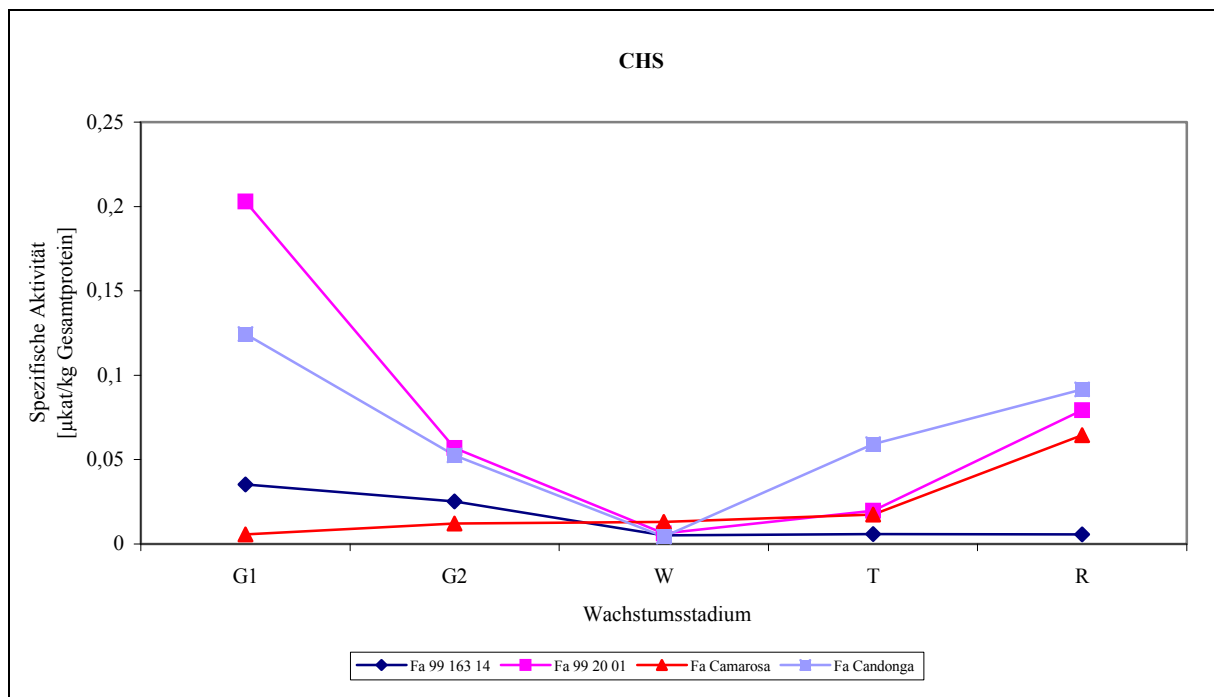


Abb. 65: Nachweis der spezifischen Aktivität der CHS im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Süden Italiens.

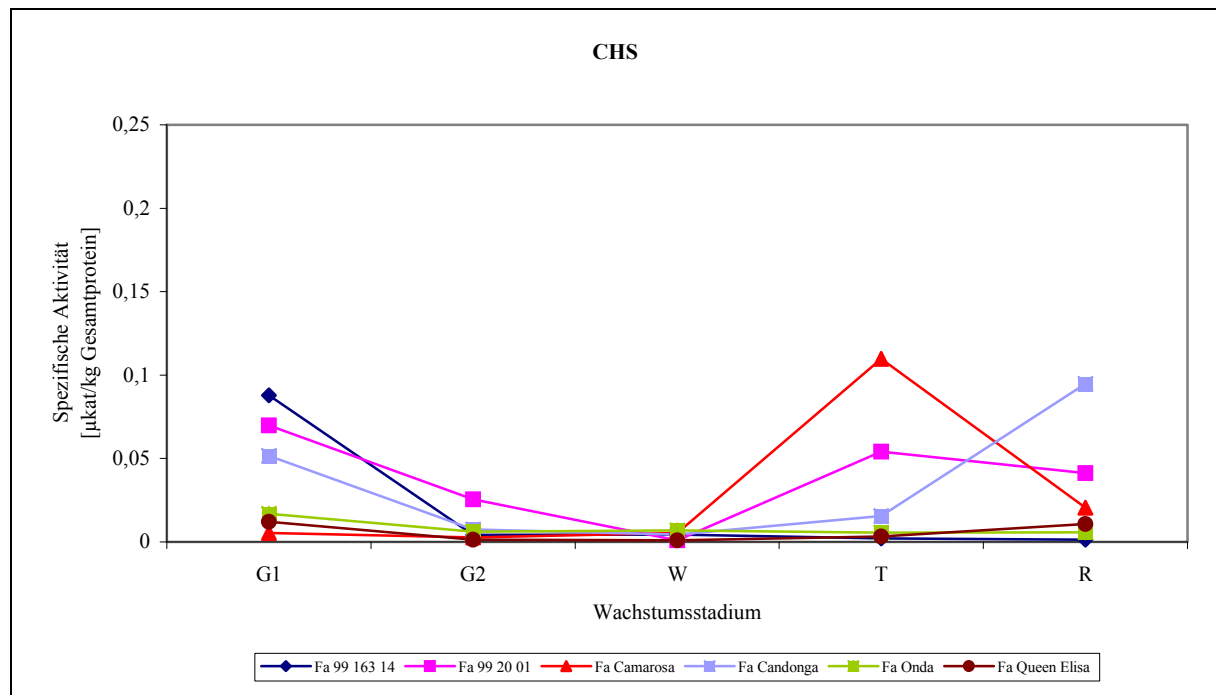


Abb. 66: Nachweis der spezifischen Aktivität der CHS im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Norden Italiens.

FHT

Auch die FHT-Aktivität in den Früchten von *F. x ananassa* folgte dem Zwei-Phasen-Muster wie die Genexpression der *FHT* während der Fruchtreifung (Abb. 65, 66). Bei der Genexpression befand sich der erste Transkriptionspeak im G1-Stadium, genau wie bei der *CHS*, fiel bis zum W-Stadium bevor eine Hochregulation zum R-Stadium stattfand (Carbone et al., 2009). Bei der spezifischen Aktivität begann die Aktivität im G1-Stadium (Norden) (Abb. 68) oder zeigte ihren ersten Höhepunkt im G2-Stadium (Süden) (Abb. 67). Die Aktivitäten fielen dann wieder bis zum W-Stadium und stiegen bis zum zweiten Aktivitätshöhepunkt im T oder R-Stadium.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der biochemischen Charakterisierung von *F. x ananassa* „Elsanta“ beobachtet werden (Halbwirth et al., 2006). In dieser Studie wurden sechs Entwicklungsstadien untersucht, dabei zeigte die FHT auch ein Zwei-Phasen-Muster. Die Maxima wurden im zweiten (unreife Früchte) und sechsten (reife Früchte) Stadium beobachtet. Aber auch bei der unabhängigen Studie mit dem Gentotyp „Queen Elisa“ konnte das gleiche Regulierungs- und Aktivitätsmuster der FHT nachgewiesen werden (Halbwirth et al., 2006)

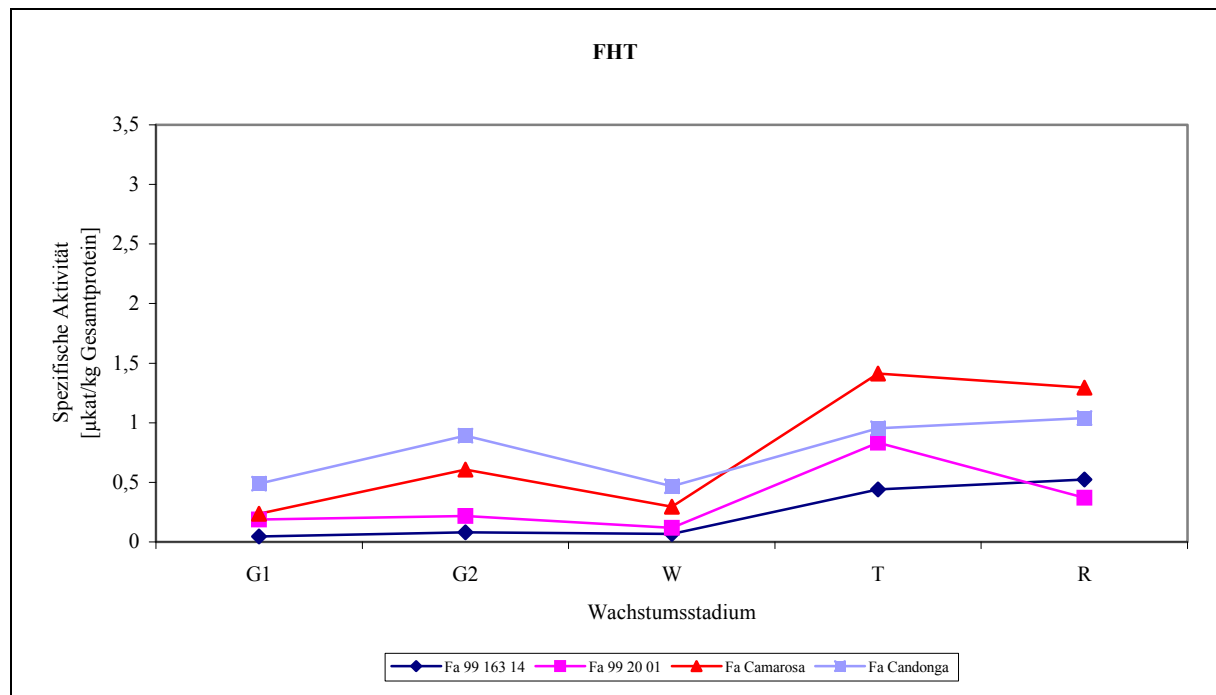


Abb. 67: Nachweis der spezifischen Aktivität der FHT im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Süden Italiens.

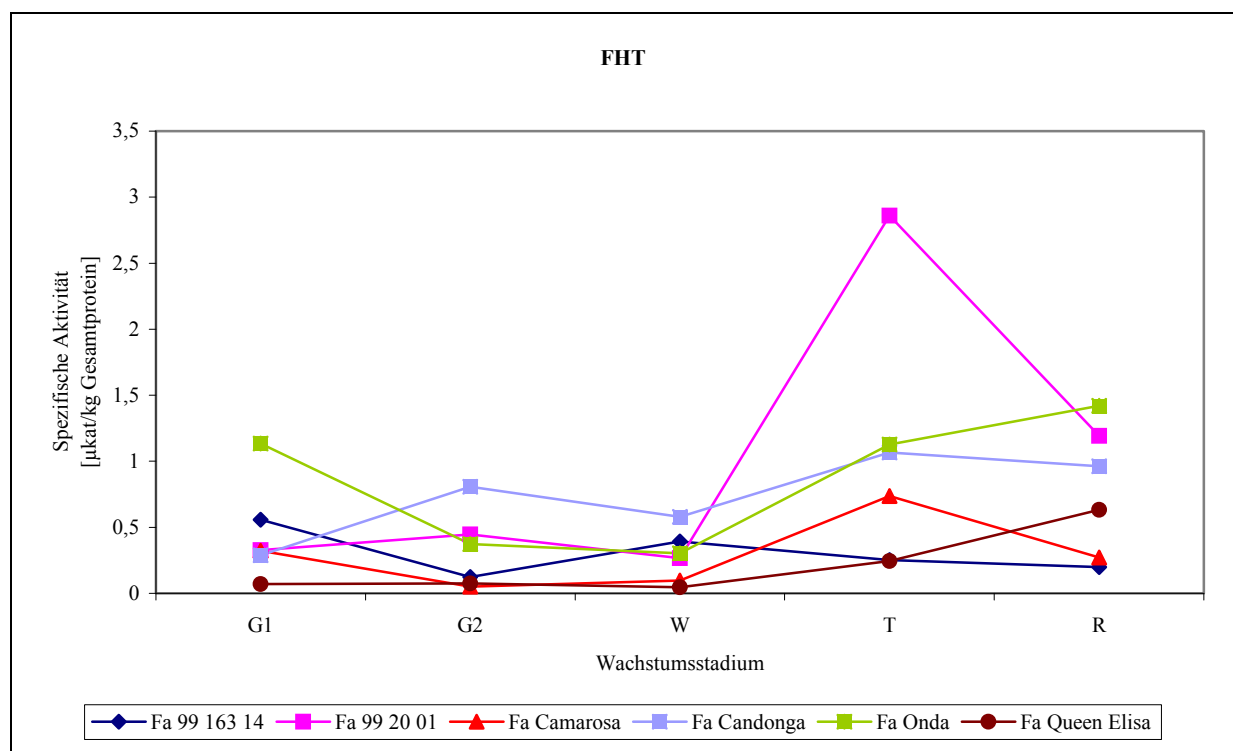


Abb. 68: Nachweis der spezifischen Aktivität der FHT im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Norden Italiens.

DFR

Aufgrund der geringen Aktivität der DFR in den Proteinrohextrakten in den Erdbeerfrüchten war kein eindeutiges Muster hinsichtlich der spezifischen Aktivität zu erkennen (**Abb. 69, 70**). Bei den Expressionsdaten der *DFR* konnte ein Ein-Phasen-Muster beobachtet werden (Carbone et al., 2009). Dabei wurde die *DFR* bis zum T/R-Stadium hochreguliert und zeigte dort ihren Transkriptionspeak. Die spezifischen Aktivitäten der DFR dagegen zeigten bei allen Genotypen, ob in Süden (**Abb. 69**) oder Norden (**Abb. 70**), zwei Peaks. Eine Ausnahme bildete „sel. 99.20.01“ aus dem Süden: dieser Genotyp zeigte in der DFR-Aktivität ein Ein-Phasen-Aktivitätsmuster, dabei stieg die DFR-Aktivität bis zum T-Stadium an, fiel zum R-Stadium wieder ab. Aufgrund der Aktivitätsschwankungen innerhalb der unterschiedlichen Sorten konnte kein Vergleich mit den Expressionsdaten erzielt werden. Dagegen konnte von Halbwirth et al. (2006) mit „Elsanta“ ein einheitliches Muster in der DFR Aktivität beobachtet werden. Die höchste Aktivität wurde im zweiten und sechsten Stadium, wie bei der FHT aus „Elsanta“, nachgewiesen, wobei beide Maxima die gleiche Intensität zeigten.

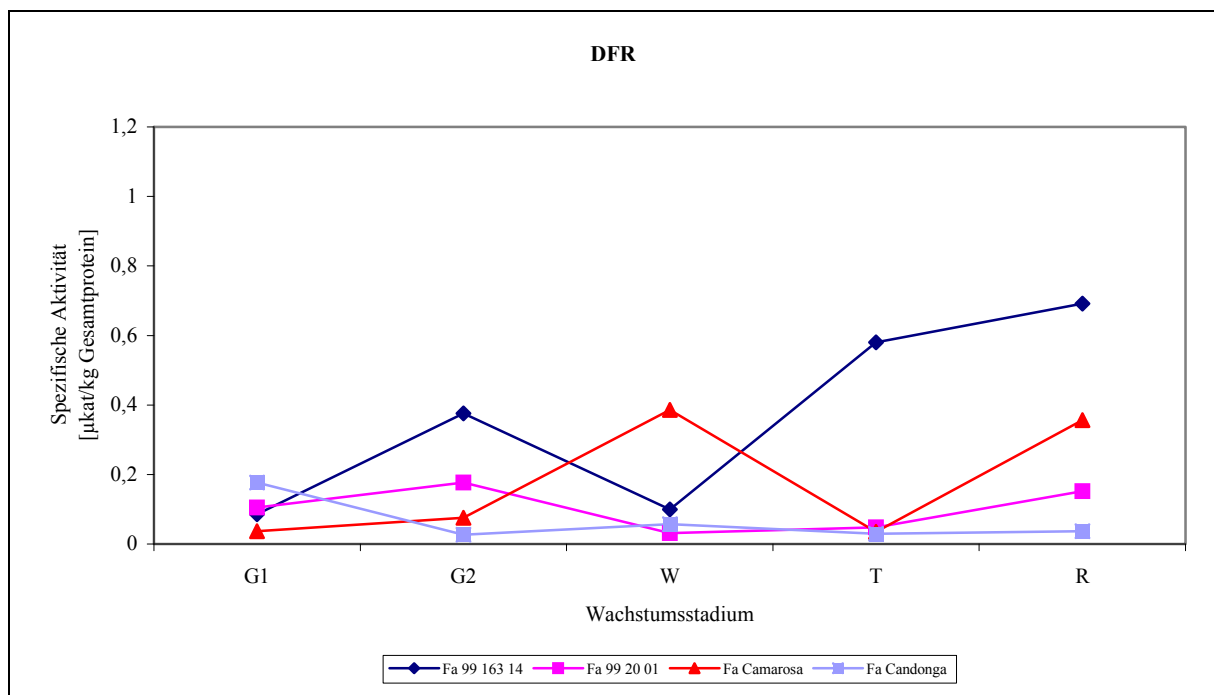


Abb. 69: Nachweis der spezifischen Aktivität der DFR im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Süden Italiens.

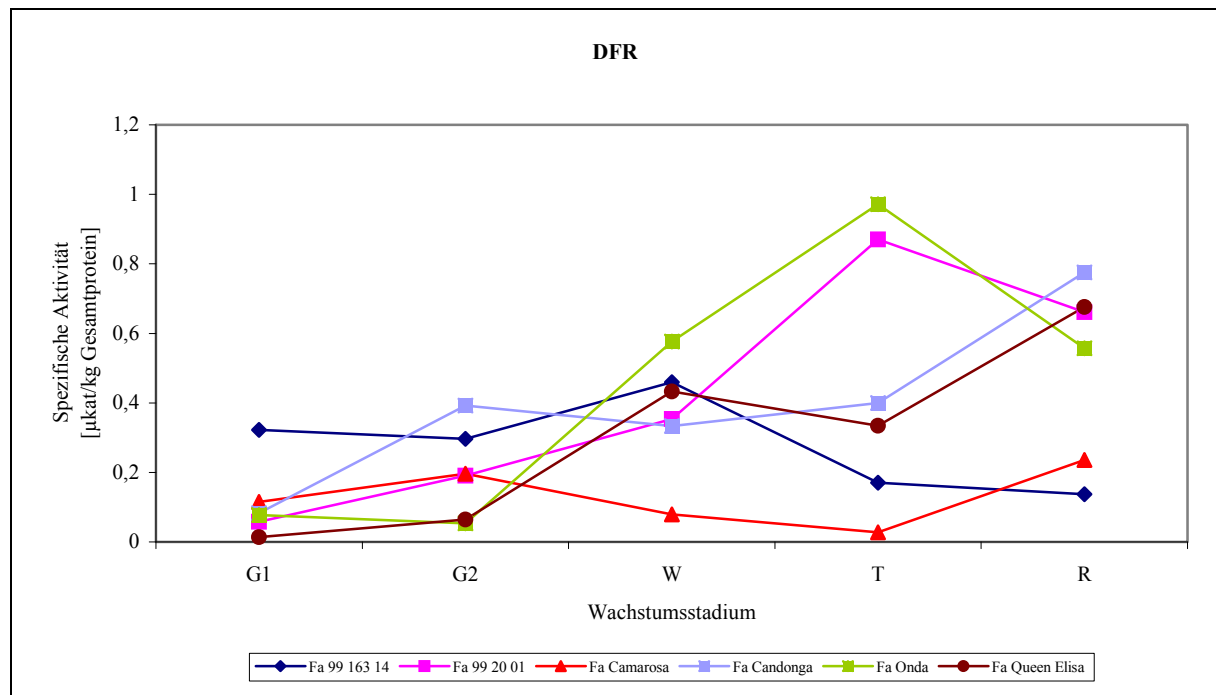


Abb. 70: Nachweis der spezifischen Aktivität der DFR im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Norden Italiens.

FGT

Die Expressionsdaten der *FGT* in den Früchten zeigten wie die *DFR* ein Ein-Phasen-Muster, wobei das Maximum im T/R-Stadium lag (Carbone et al., 2009). Wenn die spezifischen Aktivitäten der *FGT* aus dem Süden (**Abb. 71**) und Norden (**Abb. 72**) mit den Expressionsdaten verglichen werden, konnten auch hier Gemeinsamkeiten beobachtet werden. Die *FGT*-Aktivität in den Früchten zeigte bei den Genotypen im Süden (**Abb. 71**) ihre höchste Aktivität im R-Stadium und im Norden (**Abb. 72**) eher im T-Stadium. Das wiederum spiegelte die Ergebnisse der chemischen Analyse von den Früchten wieder, in denen viel Anthocyane, im R-Stadium enthalten bzw. akkumuliert wurden (Almeida et al., 2007; Carbone et al., 2009). Außerdem zeigte die *FGT* im Süden höhere Aktivität als die Genotypen aus dem Norden. Das lässt vermuten, dass die *FGT* und die damit verbundene Anthocyanbildung wahrscheinlich durch Wärme bzw. Licht beeinflusst werden kann.

Dagegen folgte die *FGT* in den Früchten von „Elsanta“ einem Zwei-Phasen-Muster, wobei auch hier die Maxima im zweiten und sechsten Stadium lagen. Zum Einen widerspricht das den Ergebnissen mit den sechs Genotypen und zum Anderen konnte bei Griesser et al. (2008) auch ein Ein-Phasen-Muster mit der FaGT1 aus „Elsanta“ beobachtet werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression und die Enzymaktivität mit einander korrelieren und

zudem auch von der Anthocyanidinbildung abhängig sind. Die höchste Expression der FaGT1 konnte im R-Stadium nachgewiesen werden, das wiederum spiegelt die Ergebnisse von Carbone et al. (2009) wieder. Zusätzlich zeigten RNAi-Untersuchungen mit der FaGT1, dass das Pg in *F. x ananassa* das Hauptanthocyanidin für die FaGT1 darstellt (Griesser et al., 2008). Durch das sogenannte „silencing“ wurde die Expression der *FaGT1* herabreguliert und somit konnte eine Abnahme des Pg-3-*O*-Glukosidgehalts nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die Flavonolglukoside keinen Unterschied in ihrem Gehalt gegenüber dem Wildtyp. Dieses Ergebnis wiederum bestätigt auch die Ergebnisse von Almeida et al. (2007) und Carbone et al. (2009), dass die rekombinante FGT das Pg als Substrat gegenüber Cy, Km und Qu bevorzugt, aber auch, dass Pg -3-*O*-Glukosid das Hauptanthocyan in *F. x ananassa* ist.

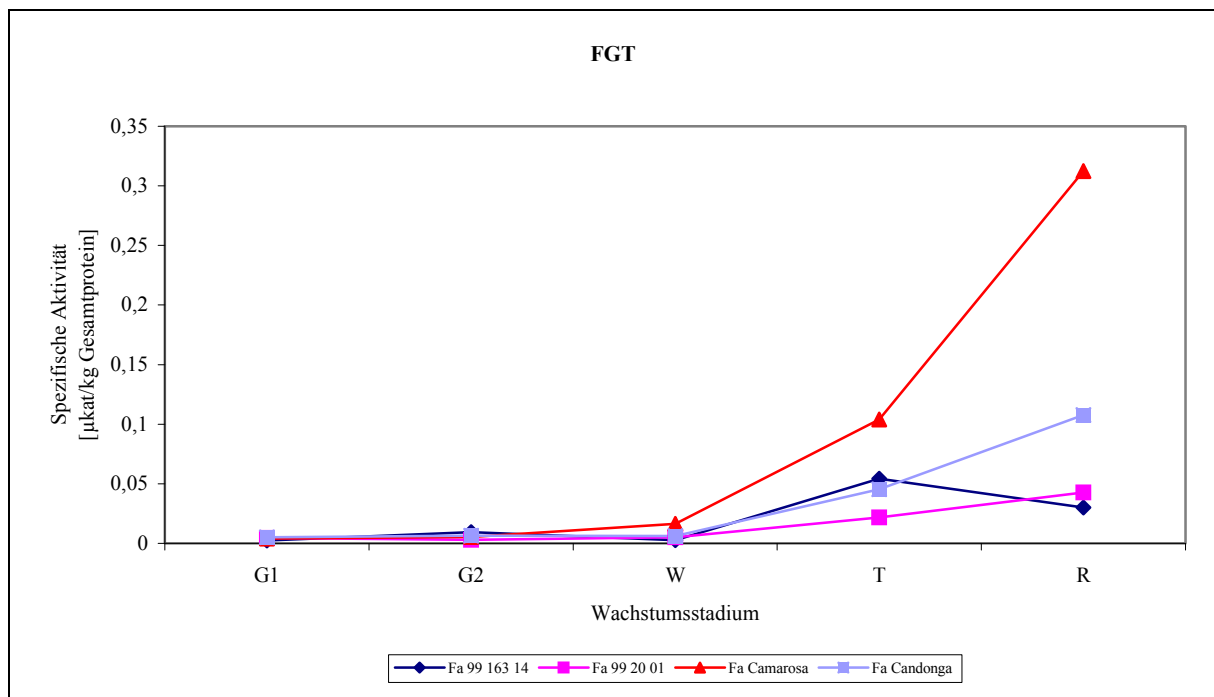


Abb. 71: Nachweis der spezifischen Aktivität der FGT im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Süden Italiens.

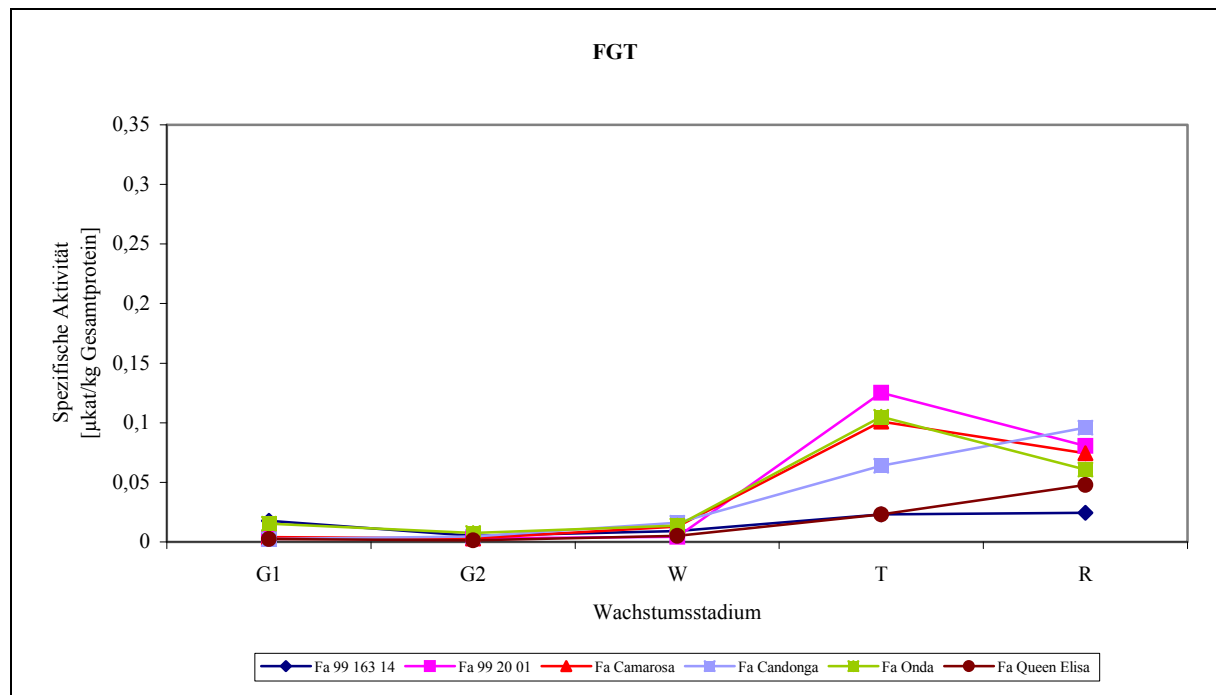


Abb. 72: Nachweis der spezifischen Aktivität der FGT im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Norden Italiens.

LAR

Die LAR sollte, wie schon die CHS und FHT, nach den Ergebnissen der Genexpression einem Zwei-Phasen-Muster folgen. Bei der Genexpression der *LAR* wurde beobachtet, dass der erste Transkriptionspeak im G1-Stadium und der zweite im R-Stadium zu finden war (Carbone et al., 2009). Die spezifische Aktivität der LAR in den Früchten zeigte ihren ersten Aktivitätshöhepunkt entweder im G1- oder G2-Stadium, sowohl im Süden (**Abb. 73**) als auch im Norden (**Abb. 74**), und korrelierten demnach mit den Expressionsdaten. Dieses Muster wiederum ist wichtig für die Bildung von Flavan-3-olen, wie Catechin, das als Erweiterungseinheit bei der Bildung von PA's benötigt wird.

Bei der Expression der LAR in jungen Trauben von *V. vinifera* konnte auch beobachtet werden, dass die LAR hochreguliert wird und während der Reifung wieder abnimmt. Das heißt die PA-Synthese beschränkt sich, wie bei *F. x ananassa*, auf die frühen Entwicklungsstadien und um die reifenden Früchte vor Fraßschutz und Pathogenen (Terrier et al., 2009) zu schützen.

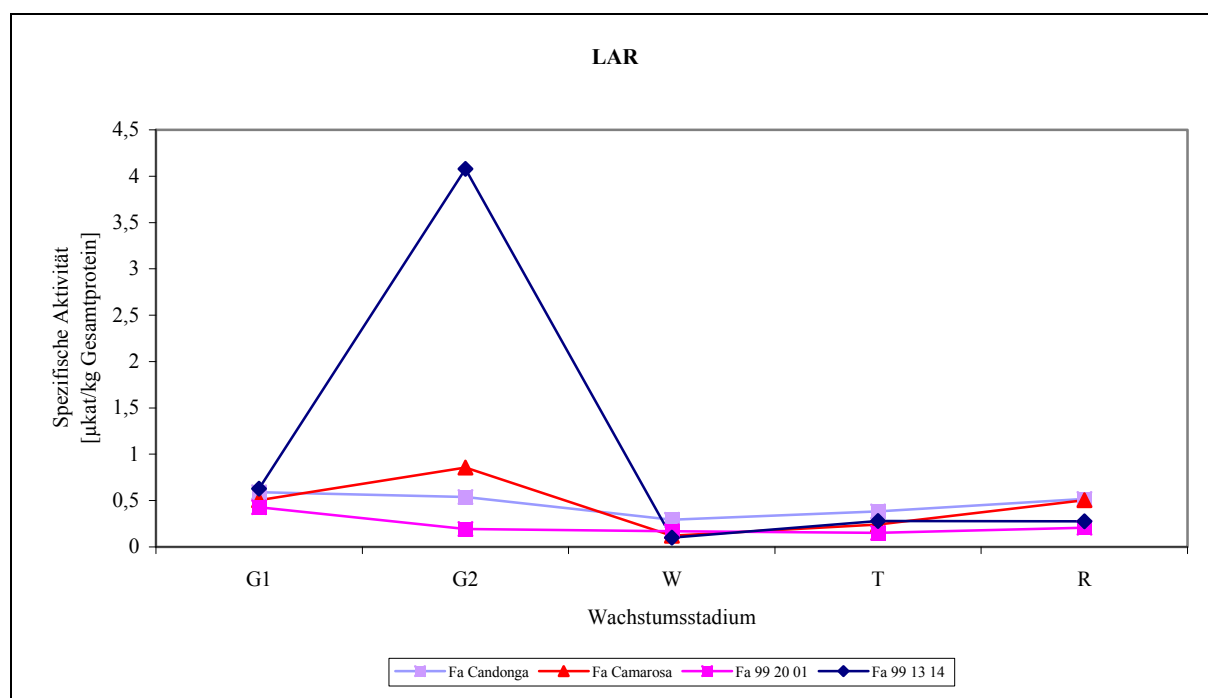


Abb. 73: Nachweis der spezifischen Aktivität der LAR im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Süden Italiens.

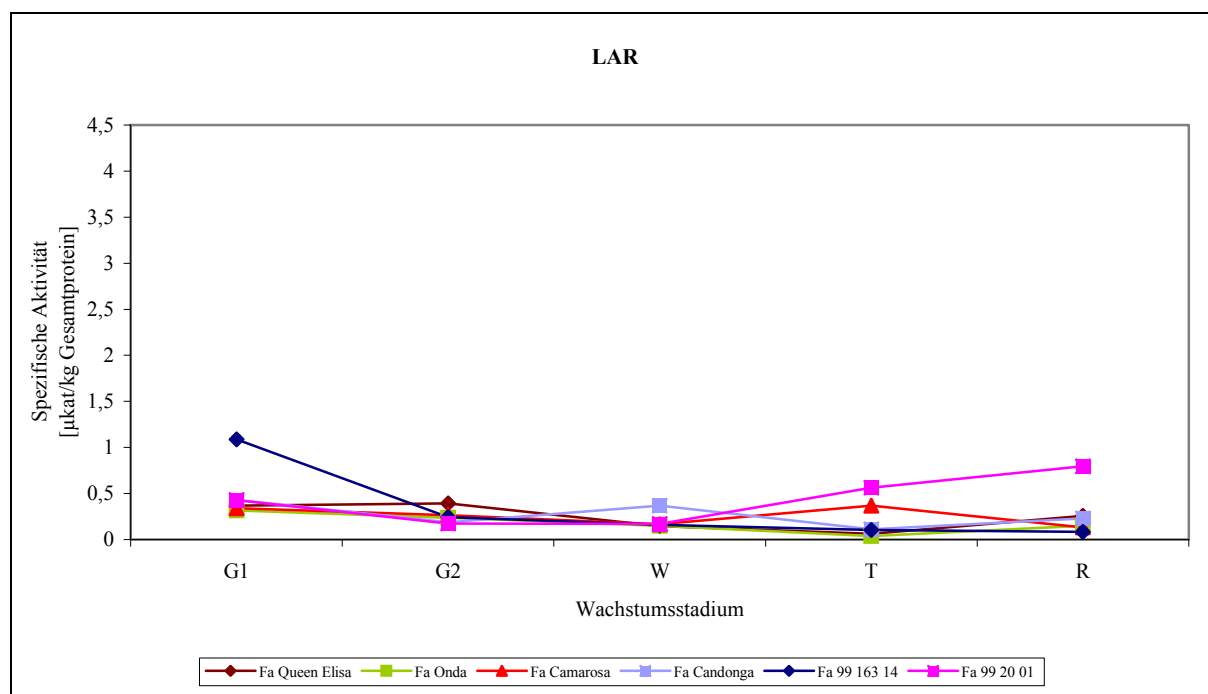


Abb. 74 Nachweis der spezifischen Aktivität der LAR im Rohextrakt aus Erdbeerfrüchten von verschiedenen Sorten aus dem Norden Italiens.

ANR

Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung mit anschließender Derivatisierung mit DMAZA (Feucht et al., 1992) konnte das gebildete Epicat nachgewiesen werden. Die Färbung mit DMAZA erlaubte aber keine quantitative Auswertung, durch das ungleiche Ansprühen der DC-Platte. Dabei konnte beobachtet werden, dass die ANR in den Stadien G1-W-Stadien Aktivität zeigte, wobei die Aktivität zum W-Stadium hin abnahm. Verglichen mit den Expressionsdaten der ANR aus den Früchten, konnte ein Ein-Phasen-Muster beobachtet werden. Das Transkriptionslevel der ANR nahm vom G1-Stadium in Richtung W-Stadium ab und blieb bis zum R-Stadium konstant (Carbone et al., 2009). Somit könnte die ANR das gleiche Muster wie die LAR in *F. x ananassa* und *V. vinifera* (Terrier et al., 2009) zeigen.

Im Allgemeinen konnten bei den untersuchten Enzymen (CHS/CHI, FHT, DFR, LAR und FGT), außer der ANR, in allen fünf Wachstumsstadien (G1-R) Aktivität nachgewiesen werden. Unterschiede in den einzelnen Genotypen, ob im Süden oder Norden Italiens angebaut, konnten nur in der spezifischen Aktivität beobachtet werden, wobei kein einheitliches Muster zu beobachten war. Die CHS zeigt in den Genotypen aus dem Süden eine höhere Aktivität, als die im Norden angebauten Genotypen, so auch bei der FGT-Aktivität. Die FHT, DFR und LAR zeigten höhere Aktivitäten eher im Norden. Diese Ergebnisse überraschen ein wenig, da davon ausgegangen worden war, dass die Flavonoidbiosynthese zum Beispiel vom Licht beeinflusst wird oder durch andere Umweltfaktoren (Koe et al., 1994; Holton & Cornish, 1995; Weisshaar & Jenkins, 1998; Winkel-Shirley, 2001). Um bessere Ergebnisse zu bekommen, sollten mehrere Proben aus verschiedenen Jahren untersucht werden, weil Wetterschwankungen, Sonnenscheindauer und Sonneneinstrahlung bei den Expressionsdaten, enzymatischen Aktivitäten und Metaboliten eine große Rolle spielen könnten.

Im Vergleich mit anderen Früchten wie *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae) (Jaakola et al., 2002) und *V. vinifera* (Boss et al., 1996) konnten Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Genexpression und Aktivität beobachtet werden. In *V. myrtillus* wurde die Genexpression von *PAL*, *CHS*, *FHT*, *DFR* und *ANS* in sechs unterschiedlichen Wachstumsstadien, von der Blüte bis zur reifen Frucht, untersucht. Wie bei *F. x. ananassa* (Manning, 1998; Almeida et al., 2007; Carbone et al., 2009) wurde ein Zwei-Phasen-Muster beobachtet. Die Gene wurden im frühen Stadium (Blüte) und in den reifen Früchten hoch reguliert. Die *CHS* und *DFR* wurden

gegenüber den anderen Genen durchgehend exprimiert, doch nur in dem zweiten und dritten Stadium wurden diese beiden Gene etwas schwächer exprimiert. Insgesamt aber hatten alle untersuchten Gene ihre höchste Expression im fünften Stadium (reife Früchte) und danach wurden sie langsam herabreguliert. Diese Ergebnisse konnten sowohl in den Blüten von *P. sativum* (Uimari & Strömmer, 1998), *A. majus* (Jackson et al., 1992) und *P. hybrida* (Quattrocchio et al., 1993), als auch in den Früchten wie *F. x ananassa* (Manning, 1998; Halbwirth et al., 2006; Almeida et al., 2007; Carbone et al., 2009; Bianco et al., 2009) und *V. vinifera* (Boss et al., 1996; Gagné et al., 2009) beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Studie mit Farbmутanten von *V. myrtillus* (mit weißen und violetten Früchten) in fünf Entwicklungsstadien (Jaakola et al., 2002). In diesen Mutanten wurde die Expression einzelner Gene reduziert, dabei konnten z. B. in der violetten Mutante die Transkripte der *ANS* nachgewiesen werden, jedoch nicht in der weißen Mutante. Nur die Expression der *PAL* und der *DFR* konnte in der weißen Mutante beobachtet werden. Unterschiede konnten auch in den Metaboliten der Mutanten festgestellt werden. Zum Beispiel zeigte das Flavonol Qu im Wildtyp und in der weißen Mutante den höchsten Gehalt in den Blüten und nahm während der Fruchtreifung hin ab, dagegen kam das Qu in der violetten Mutante in geringerer Konzentration vor. Die PA's konnten im Wildtyp und in der violetten Mutante wie auch schon in *F. x ananassa* und *V. vinifera* (Boss et al., 1996; Terrier et al., 2009) in den frühen Entwicklungsstadien bis zum Beginn der Anthocyanbildung (viertes Stadium) nachgewiesen werden. Ausnahme dabei spielte die weiße Mutante, in der keine Anthocyane gebildet werden. Das heißt, die Akkumulation der Metabolite spiegelt die Aktivität der einzelnen Enzyme wieder. Der mRNA Gehalt von *CHS*, *FHT*, *DFR* und *ANS* nimmt im Laufe der Entwicklung in Konkurrenz zur Anthocyanbildung zu (Jaakola et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien mit *P. sativum* (Uimari & Strömmer, 1998), *A. majus* (Jackson et al., 1992) und *P. hybrida* (Quattrocchio et al., 1993). Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Strukturgenen mit der Enzymaktivität während der Reifung korrelieren (Jaakola et al., 2002).

7 Zusammenfassung

Sowohl Flavonole als auch PA's sind als Sekundärmetabolite im Pflanzenreich weit verbreitet, und sie kommen vor allem in Gemüse und Obst vor (Pietta et al., 2000). Aufgrund ihrer pharmazeutischen Eigenschaften übernehmen sie wichtige Funktionen in der Pflanze, aber auch im menschlichen Organismus (Ross et al., 2002; Thompson et al., 1976; Pietta et al., 2002; Bagchi et al., 2000; Middleton et al., 2000; Pagonis et al., 1986; Harborne et al., 2000; Lee et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Flavonolsynthese in *A. thaliana*, sowie die PA-Synthese in *F. x ananassa* untersucht.

Die Bildung der Flavonole wird durch die FLS (2-ODD) katalysiert, indem eine Doppelbindung zwischen dem C2 und C3 von Dihydroflavonolen eingefügt wird. Die PA's werden aus den Monomeren, Flavan-3-olen (Cat, Epicat), synthetisiert, obwohl noch nicht bekannt ist, ob und welches Enzym für die Polymerisierung verantwortlich ist. Bis jetzt liegen nur Theorien zu möglichen Reaktionsmechanismen vor (Dixon et al., 2005). Die Flavan-3-ole werden durch NADPH-abhängige Reduktasen, LAR und ANR, gebildet, indem das C4-Carbonyl von Leucoanthocyanidinen und Anthocyanidinen abgespalten wird.

- In den Pflanzenextrakten von *Arabidopsis* Wildtyp (*Col-0*), FLS1-Mutante (*fls1-2m*) und ANS/FLS1-Doppelmutante (*ldox/fls1-2m*) konnten Flavonole nachgewiesen werden. Einerseits bestätigte das die *in vivo* Beteiligung der ANS an der Flavonolsynthese in *A. thaliana*. Andererseits erfordert der restliche Flavonolgehalt der Doppelmutante eine weitere FLS-Aktivität.
- Im *Arabidopsis* Genom wurden neben FLS1 fünf weitere putative FLS-Gene (FLS2, 3, 4, 5, 6) gefunden (Pelletier et al., 1999; Owens et al., 2008; Stracke et al., 2009), wobei die FLS4 und FLS6 Pseudogene darstellen (Owens et al., 2008; Stracke et al., 2009). Die ANS dagegen liegt als „single copy“ Gen im *Arabidopsis* Genom vor (Prescott et al., 2002).
- FLS1, 2, 3 und 5 sowie ANS aus *Arabidopsis* wurden in *S. cerevisiae* und *E. coli* funktionell exprimiert, wobei nur die At_FLS1 und die At_ANS unter Standardbedingungen FLS-Aktivität zeigten (Owens et al., 2008; Preuss et al., 2009).

- Die Westernblot-Analyse zeigte die immunologische Verwandtschaft der FLSs (Lukačín et al., 2003), und dass alle vier FLS-Polypeptide exprimiert werden.
- At_ANS wurde als His-Tag- (pYES2.1 TOPO) (Gebhardt et al., 2005) und ANS/MBP-Fusionsprotein (pMal c4x) (Saito et al., 1999) gereinigt. Aktivitätsschwankungen nach der His-Tag-Reinigung bzw. die fehlende Aktivität als ANS/MBP-Fusionsprotein verhinderten die detaillierte biochemische Charakterisierung.
- Die Sequenzen der vier FLS Proteine und der ANS zeigten, dass At_FLS1, At_FLS3 und At_ANS konservierte Eisen-, 2-Oxoglutarat- und Substratbindungsstellen (Gebhardt et al., 2007; Owens et al., 2008; Preuss et al., 2009) aufweisen.
- Die Homologiemodelle von At_FLS1 und At_FLS3 sollten die Ergebnisse der Sequenzanalyse untermauern. Dafür wurde die Kristallstruktur von At_ANS-NAR bzw. DHQ-Komplexen herangezogen (Wilmouth et al. 2002). Die Berechnungen wiesen für die At_FLS3 auf eine leichte Verschiebung von ¹⁴⁹His hin, das an der Substratbindung beteiligt ist. Diese könnte die Aktivität der At_FLS3 *in vitro* beeinflussen.
- Die Biotransformation mit At_FLS3 ergab nur durch eine relativ hohe Menge an Substrat und deutlich längere Inkubationszeiten den Umsatz von Dihydroflavonolen zu Flavonolen. Somit könnte At_FLS3 an der Flavonolbiosynthese in *A. thaliana* beteiligt sein.
- Die rekombinanten Proteine FHT, FLS, DFR, LAR, ANS, ANR und FGT aus *F. x ananassa* konnten in *S. cerevisiae* und *E. coli* (FGT) funktionell exprimiert werden. FHT, FLS, DFR, ANS, ANR und FGT können sowohl 4'-hydroxylierte Flavonoide als auch 3',4'-dihydroxylierte Flavonoide umsetzen. Bevorzugt wurden aber die 4'-hydroxylierten Flavonoide, wobei die ANR eher die 3', 4'-hydroxylierten Anthocyanidine bevorzugte. Die LAR zeigte nur mit 3',4'-hydroxylierten Flavonoiden Aktivität.
- Für die biochemische Charakterisierung der Erdbeerfrüchte standen sechs Sorten (Genotypen) von *F. x ananassa* aus dem Norden und Süden Italiens mit fünf Wachstumsstadien (G1, G2, W, T, R) zur Verfügung. In allen Sorten und Wachstumsstadien konnten mit Hilfe der Dellus-Aufarbeitung die Enzyme CHS/CHI, FHT, DFR, LAR, ANR, FGT nachgewiesen werden, wobei die ANR-Aktivität nur in

- den Stadien G1-W beobachtet werden konnte. Die Genexpression korrelierte mit der Enzymaktivität. Dabei wurden verschiedene Muster, bezogen auf die Wachstumsstadien, beobachtet: (1) Zwei-Phasen-Muster: CHS, CHI, FHT, LAR und ANS, wobei der erste Peak (Transkript bzw. spezif. Aktivität) im G1-Stadium und der zweite im T/R-Stadium auftritt. (2) Ein-Phasen-Muster: DFR und FGT zeigten einen Anstieg der Expression und der Aktivität bis zum T/R-Stadium. (3) Ein-Phasen-Muster: bei der F3'H, FLS und ANR nimmt die Expression und Aktivität zum R-Stadium hin ab.

8 Anhang

8.1 End-to-End Primer

AtLDOX2.1f 5`-GTC ATG GTT GCG GTT GAA AGA G-3`

AtLDOX2.1r 5`-GTA ACG GCC GCC AGT GTG-3`

AtLDOXpMALf 5`-CAG GGA TCC ATG GTT GCG-3`

AtLDOXpMALr 5`-CAG AGG CTT GTA GTA ACG GCC-3`

9 Literatur

- Aaby**, K., G. Skrede and R. E. Wrolstad (2005). "Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*).” *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4032-4040.
- Aharoni**, A., C. H. de Vos, H. A. Verhoeven, C. A. Maliepaard, G. Kruppa, R. Bino and D. B. Goodenowe (2002). "Nontargeted metabolome analysis by use of fourier transform ion cyclotron mass spectrometry”. *OMICS* **6**, 217-234.
- Ahmad**, N., S. Gupta and H. Mukhtar (2000). "Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kB in cancer cells versus normal cells.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* **376**, 338-346.
- Almeida**, J. R. M., E. D'Amico, A. Preuss, F. Carbone, C. H. Ric de Vos, B. Deiml, F. Mourgues, G. Perrotta, T. C. Fischer, A. G. Bovy, S. Martens and C. Rosati (2007). "Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*).” *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**, 61-71.
- Anzellotti**, D. and R. K. Ibrahim (2004). "Molecular characterization and functional expression of flavonol 6-hydroxylase.” *BMC Plant Biology* <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/20>.
- Bagchi**, D., M. Bagchi, S. J. Stohs, D. K. Das, S. D. Ray, C. A. Kuszynski, S. S. Joshi and H. G. Pruess (2000). "Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention.” *Toxicology* **148**, 187-197.
- Bais**, H. P., R. Vepachedu, S. Gilroy, R. M. Callaway and J. M. Vivanco (2003). "Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions.” *Science* **301**, 1377-1380.
- Boudet**, A.-M. (2007). "Evolution and current status of research in phenolic compounds. ” *Phytochemistry* **68**, 2722-2735.
- Boss**, P. K., C. Davies and S. P. Robinson (1996). "Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation”. *Plant Physiol.* **111**, 1059-1066.
- Bradford**, M., M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- Britsch, L., W. Heller and H. Grisebach (1981).** "Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell culture of parsley." *Z. Naturforsch.* **36**, 742-750.
- Britsch, L., H. Grisebach (1985).** "Improved preparation and assay of chalcon synthase." *Phytochemistry*, **24**, 1975-1976.
- Britsch, L. (1990).** "Purification and characterization of flavon synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent desaturase." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **282**, 152-160.
- Britsch, L., B. Ruhnau-Brich and G. Forkmann (1992).** "Molecular cloning, sequence analysis and *in vitro* expression of flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*." *J. Biol. Chem.* **267**, 5380-5387.
- Broun, P (2005).** "Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*." *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 272-279.
- Brugliera, F., G. Barri-Rewell, T. A. Holton and J. G. Mason (1999).** "Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*". *Plant Journal* **19**, 441-451.
- Carbone, F., F. Mourgues, F. Biasioli, F. Gasperi, T. D. Märk, C. Rosati and G. Perrotta (2006).** "Development of molecular and biochemical tools to investigate fruit quality traits in strawberry elite genotypes." *Mol. Breeding* **18**, 127-142.
- Cheng, G. W., D. A. Malencik and P. J. Breen (1993).** "UDP-Glucose: Flavonoid O-glucosyltransferase from strawberry fruit". *Phytochemistry* **35**, 1435-1439.
- Clifton, I. J., L-C. Hsueh, J. E. Baldwin, K. Harlos and C. J. Schofield (2001).** "Structure of proline 3-hydroxylase: evolution of the family of 2-oxoglutarate dependent oxygenases." *Eur. J. Biochem.* **268**, 6625-6636.
- Constantinou, A., R. Mehta, C. Runyan, K. Rao, A. Vaughan and R. Moon (1995).** "Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships." *J. Nat. Prod.* **58**, 217-225.
- Creasey, L. L. and T. Swain (1965).** "Structure of condensed tannins." *Nature* **208**, 151-153.
- Dauer, A., A. Hensel, E. Lhoste, S. Knasmueller and S. V. Mersch (2003).** "Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis." *Phytochemistry* **63**, 199-207.
- Davies, K. M. (1993).** "A *Malus* cDNA with homology to the *Antirrhinum candica* and *Zea A2* genes." *Plant Physiol.* **103**, 1015.

- Dellus**, V., W. Heller, H. Sandermann and A. Scalbert (1997). "Dihydroflavonol 4-reductase activity in lignocellulosic tissue." *Phytochemistry* **45**, 1415-1418.
- Diesperger**, H., C. R. Müller and H. Sandermann (1974). "Rapid isolation of a plant microsomal fraction by Mg^{2+} precipitation." *FEBS letters* **43**, 155-158.
- Dixon**, R. A., D-Y. Xie and S. B. Sharma (2005). "Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research?." *New Phytologist* **165**, 9-28.
- Dooner**, H. K. and T. P. Robbins (1991). "Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis." *Annu. Rev. Genet.* **25**, 173-199.
- Doostdar**, H., J. p. Shapiro, R. Niedz, M. D. Burke, T. G. McCollum, R. E. McDonald and R. T. Mayer (1995). "A cytochrom P450-mediated naringenin 3'-hydroxylase from sweet orange cell culture". *Plant Cell Physiology* **36**, 36-77.
- van Eldik**, G. J., W. H. Reijnen, R. K. Ruiter, M. M. van Herpen, J. A. Scrauwen and G. J. Wullems (1997). "Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*." *Plant Journal* **11**, 105-113.
- Engbrecht**, J., R. Brent and M. A. Kaderbhai (2001). "Minipreps of plasmid DNA." *Current Protocols in Molecular Biology* E. W. Harkins, John Wiley & Sons, Inc.
- Fait**, A., K. Hanhineva, R. Beleggia, N. Dai, I. Ragchev, V. J. Nikiforova, A. R. Fernie and A. Aharoni (2008). "Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development". *Plant Physiology* **148**, 730-750.
- Feucht**, W., D. Treutter and E. Christ (1992). "Localization and quantitative determination of catechins and proanthocyanidins in phloem of elm and cherry". *Tree Physiology* **10**, 169-177.
- Ferreira**, D., J. P. J. Marais and D. Slade (2003). "Phytochemistry of the mopane, *Colophospermum mopane*." *Phytochemistry* **64**, 31-51.
- Fool**, Y. and L. J. Porter (1980). "The phytochemistry of proanthocyanidin polymers." *Phytochemistry* **19**, 1747-1754.
- Forrest**, G. I., D. S. Bendall (1969). "The distribution of polyphenols in the tea plant (*Camellia sinensis*)." *Biochemical Journal* **113**, 741-755.
- Forkmann**, G., P. deVlaming, R. Spirille, H. Wiering and A. W. Schramm (1986). "Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols to flavonols in flowers of *Petunia hybrida*." *Z. Naturforsch.* **41c**, 179-186.
- Forkmann**, G. (1991). "Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering." *Plant Breed* **106**, 1-26.
- Forkmann**, G. and W. Heller (1999). "Biosynthesis of flavonoids." *Comprehensive Natural Products Chemistry*, ed D. Barton, K. Nakanishi, Elsevier, p. 713.

- Fujita, A., N. Sona, N. Goto-Yamamoto, H. Skindo, T. Kakuta, T. Koizumi and K. Haskizume (2005).** "Anthocyanidin reductase gene expression and accumulation of flavan 3-ols in grape berry." *Am. J. Enol. Vitic.* **56**, 336-342.
- Gagné, S., S. Lacampagne, O. Claisse and L. GénY (2009).** "Leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase gene expression and activity in flowers, young berries and skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauignon during development." *Plant Physiology and Biochemistry* **in press**, 1-9.
- Galati, G. and P. J. O'Brien (2004).** "Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties." *Free Radical Biology & Medicine* **37**, 287-303.
- Gebhardt, Y., S. Witte, G. Forkmann, R. Lukačín, U. Matern and S. Martens (2005).** "Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family Apiaceae." *Phytochemistry* **66**, 1273-1284.
- Gebhardt, Y. H., S. Witte, H. Steuber, U. Matern and S. Martens (2007).** "Evolution of flavone synthase I from parsley flavanone 3 β -hydroxylase by site-directed mutagenesis". *Plant Physiol.* **144**, 1442-1454.
- Gonzalez de Colmenares, N., J. R. Ramirez-Martinez and B. Aldana-Mendez (1998).** "Isolation, characterization and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**, 368-372.
- Gould, K. S. and C. Lister (2006).** "Flavonoid functions in plants". In *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications* (eds Ø. M. Andersen & K. R. Markham), pp. 397-441. CRC Press, Boca Raton.
- Grotewohl, E., B. J. Drummond, B. Bowen and T. Peterson (1994).** "The *myb*-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentations in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset". *Cell* **76**, 543-553.
- Guan di, C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye (1988).** "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding-protein." *Gene* **67**, 21-30.
- Hagmann, M. L., W. Heller and H. Griseback (1983)** "Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3'-hydroxylase from parsley cell cultures". *Eur. J. Biochem.* **134**, 547-554.
- Halbwirth, H., I. Puhl, K. Jesik, D. Treutter and K. Stich (2006).** "Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1479-1485.

- Halbwirth**, H., T. C. Fischer, K. Schlangen, W. Rademacher, K. J. Schleifer, G. Forkmann and K. Stich (2006). "Screening for inhibitors of 2-oxoglutarat-dependent dioxygenase: flavanone 3 β -hydroxylase and flavonol synthase". *Plant Sci.* **171**, 194-205.
- Harborne**, J. B. and R. J. Grayer (1994). "Flavonoids and insects." *Harborne J. B., The Flavonoids-Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall, London*, p. 589-618.
- Harborne**, J., B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Haslam**, E. (1977). "Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry." *Phytochemistry* **16**, 1625-1640.
- Haslam**, E. (1980). "In vino veritas : oligomeric procyanidins and the aging of red wines." *Phytochemistry* **19**, 2577-2582.
- Holton**, T. A., F. Brugliera and Y. Tanaka (1993). "Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*." *Plant Journal* **4**, 1003-1010.
- Holton**, T. A. and E. C. Cornish (1995). "Genetics and biochemistry of anthocyan biosynthesis". *Plant Cell* **7**, 1071-1083.
- Jackson**, D., K. Roberts and C. Martin (1992). "Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*". *Plant J.* **2**, 425-434.
- Jeong**, S. T., N. Goto-Yamamoto, K. Hashizume, M. Esaka (2006). "Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*)." *Plant Science* **170**, 61-69.
- Kim**, J. H., B. G. Kim, J. H. Ko, Y. Lee, H-G. Hur, Y. Lim and J-H. Ahn (2006). "Molecular cloning, expression and characterization of a flavonoid glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*". *Plant Science* **170**, 897-903.
- Kivirikko**, K. I. and J. Myllyharju (1998). "Prolyl 4-hydroxylase and their protein disulfide isomerase subunit." *Matrix Biol.* **16**, 357-368.
- Kivirikko**, K. I. and T. Pihlajaniemi (1998). "Collagenhydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases." *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **2**, 325-400.
- Knott**, J. (2004). "Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rose und Kartoffel, Technische Universität München.
- Koes**, R. and R. Quattrocchio (1994). "The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution". *Mol. J.* **16**, 123-132.

- Kondo**, K., M. Kurihawa, K. Fukuhara, T. Tanaka, T. Suzuki, N. Miyata and M. Toyoda (2000). "Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence of abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation." *Tetrahedron Letters* **41**, 485-488.
- Kristiansen**, K. N. (1986). "Conversion of (+)-dihydroquercetin to (+)-2,3-*trans*-3,4-*cis*-leucocyanidin and (+)-catechin with enzyme extract from maturing grains of barley." *Carlsberg Research Communications* **51**, 51-60.
- Laemmli**, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**, 680-684.
- Lankenbrink**, C., U. H. Engelhardt and V. Wray (1999). "Identification of two novel proanthocyanidins in green tea." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4621-4624.
- Larson**, R. and J. B. Bussard (1986). "Microsomal flavonoid 3'-monooxygenases from maize seedlings". *Plant Physiol.* **80**, 483-486.
- Lee**, H. C., A. M. Jenner, C. S. Low and Y. K. Lee (2006). "Effects of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota." *Research in Microbiology* **157**, 876-884.
- Leonard**, E., S. Witte, Y. Yan, Y. Gebhardt, S. Martens and M. Koffas (2004). "Biochemical characterization of dihydroflavonol 4-reductase from plant and microbial species". *American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting* Omnipress, Austin, TX.
- Li**, J., T. M. Ou-Lee, R. Raba, R. G. Amundson and R. L. Last (1993). "Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation." *The Plant Cell* **5**, 171-179.
- Lin**, L-C., Y-C. Kuo and C-J. Chou (2002). "Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*." *J. Nat. Prod.* **65**, 505-508.
- Lukačín**, R. and L. Britsch (1997). "Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase". *Eur. J. Biochem.* **249**, 748-757.
- Lukačín**, R., I. Gröning, E. Schiltz, L. Britsch and U. Matern (2000). "Purification of recombinant flavanone-3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida* and assignment of primary site of proteolytic degradation." *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 364-370.
- Lukačín**, R., I. Gröning, U. Pieper and U. Matern (2000). "Site-directed mutagenesis of the active site serin 290 in flavanone-3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*." *Eur. J. Biochem.* **267**, 853-860.

- Lukačin, R.**, U. Matern, K. T. Junghans, M-L. Heskamp, L. Britsch, G. Forkmann and S. Martens (2001). "Purification and antigenicity of flavon synthase I from irradiated parsley cells." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **393**, 177-183.
- Maina, C. V.**, P. D. Riggs, A. G. Grandea III, B. E. Slatko, L. S. Moran, J. A. Tagliamonte, L. A. McReynolds and C. di Guan (1988). "An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding-protein." *Gene* **74**, 365-373.
- Majhenič, L.**, M. Škerget and Ž. Knez (2007). "Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts." *Food Chemistry* **104**, 1258-1268.
- Manning, K.** (1998). "Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and a possible relationship to fruit quality traits". *Planta* **205**, 622-631.
- Markham, T. R.**, G. J. Tanner, M. Caasi-Lit, M. I. Whitecross, M. Nayudu and K. A. Mitchell (1998). "Possible protective role for 3',4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in tolerant rice cultivar." *Phytochemistry* **49**, 1913-1919.
- Martens, S.** and G. Forkmann (1999). "Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* hybrids." *The Plant Journal* **20**, 611-618.
- Martens, S.**, G. Forkmann, U. Matern and R. Lukačin (2001). "Cloning from parsley flavone synthase I." *Phytochemistry* **58**, 43-46.
- Martens, S.** and A. Mithöfer (2005). "Flavones and flavone synthases." *Phytochemistry* **66**, 2399-2407.
- Martin, C.**, A. Prescott, S. Mackay, J. Bartlett and E. Vrijlandt (1991). "Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*." *Plant Journal* **1**, 37-49.
- Menssen, A.**, S. Höhmann, W. Martin, P. S. Schnable, P. A. Peterson, H. Saedler and A. Gierl (1990). "The En/Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the termini generating a novel intron from a dSpm element in the A2 gene." *EMBO J.* **9**, 3051-3058.
- Middelton, E. J.** and C. Kandaswami (1994). "The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer." *Harborne J. B., The Flavonoids-Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall, London*, p. 621-622.
- Middelton, E.**, C. Kandaswami and T. C. Theoharides (2000). "The effects of plant flavonoids and mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer." *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751.

- Moriguchi**, T., M. Kita, K. Ogawa, Y. Tomono, T. Endo and M. Omura (2002). "Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development." *Physiologia Plantarum* **114**, 251-258.
- Nagle**, D. G., D. Ferreira and Y-D. Zhou (2006). "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemicals and biomedical perspectives." *Phytochemistry* **67**, 1849-1855.
- Owens**, D. K., K. C. Crosby, J. Runac, B. A. Howard and B. S. J. Winkel (2008). "Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3 β -hydroxylase." *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 833-843.
- Owens**, D. K., A. B. Alerding, K. C. Crosby, A. B. Bandara, J. H. Westwood and B. S. J. Winkel (2008). "Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* **147**, 1046-1061.
- Pagonis**, C., A. I. Tauber, A. Pavlotsky and E. R. Simon (1986). "Flavonoid impairment of neutrophil response." *Biochem. Pharmacol.* **35**, 237-245.
- Pang**, Y., G. J. Peel, S. B. Sharma, Y. Tang and R. A. Dixon (2008). "A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*." *PNAS* **105**, 14210-14215.
- Peer**, W. A., D. E. Brown, B. W. Tague, G. K. Muday, L. Taiz and A. S. Murphy (2001). "Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*." *Plant Physiology* **126**, 536-548.
- Pelletier**, M. K., J. R. Murrell and B. W. Shirley (1997). "Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*." *Plant Physiol.* **113**, 1437-1445.
- Pelletier**, M. K., I. E. Burbulis and B. Winkel-Shirley (1999). "Disruption of specific flavonoid genes enhance the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in *Arabidopsis* seedlings." *Plant Molecular Biology* **40**, 45-54.
- Petit**, P., T. Granier, B. Langlois d'Estaintot, C. Manigand, K. Bathany, J-M. Schmitter, V. Lauvergeat, S. Hamdi and B. Gallois (2007). "Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis". *J. Mol. Biol.* **368**, 1345-1357.
- Pfeiffer**, J., C. Kühnel, J. Brandt, D. Duy, P. A. N. Punyasiri, G. Forkmann and T. C. Fischer (2006). "Biosynthesis of flavan 3-ols by leucocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops." *Plant Physiology and Biochemistry* **44**, 323-334.
- Pietta**, P. G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.

- Pinto**, M., F. M. Lajalo and M. I. Genovese (2008). "Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.)." *Food Chemistry* **107**, 1629-1635.
- Pompon**, D., B. Louerat, A. Bronne, B. Urban (1996). "Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environment." *Methods in Enzymology* **272**, 51-64.
- Prescott**, A. G. and D. M. Lloyd (2000). "The iron and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism." *Nat. Prod. Rep.* **17**, 367-383.
- Prescott**, A. G., N. P. J. Stamford, G. Wheeler and J. L. Firmin (2002). "In vitro properties of recombinant flavonol synthase from *Arabidopsis thaliana*." *Phytochemistry* **60**, 589-593.
- Preuß**, A., R. Stracke, B. Weisshaar, A. Hillebrecht, U. Matern and S. Martens (2009). "*Arabidopsis thaliana* expresses a second functional flavonol synthase." *FEBS Lett.* **583**, 1981-1986.
- Punyasiri**, P. A. N., I. S. B. Abeysinghe, V. Kumar, D. Treutter, D. Duy, C. Gosch, S. Martens, G. Forkmann and T. C. Fischer (2004). "Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **431**, 22-30.
- Quattrocchio**, F. M., J. Wing, H. Leppen, J. Mol and R. Koes (1993). "Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes". *Plant Cell* **5**, 1497-1512.
- Reed**, J. D. (1995). "Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* **73**, 1516-1528.
- Rice-Evans**, C., N. J. Miller and G. Paganda (1996). "Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radical Biology & Medicine* **20**, 933-956.
- Roach**, P. L., I. J. Clifton, V. Fülöp, K. Harlos, G. J. Barton, J. Hajdu, I. Andersson, C. J. Schofield and J. E. Baldwin (1995). "Crystal structure of isopenicillin N-synthase is the first from a new structural family of enzymes." *Nature* **375**, 700-704.
- Ross**, J. A. and C. M. Kasum (2002). "Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety." *Annu. Rev. Nutrition* **22**, 19-34.
- Routaboul**, J-M., L. Kerhoas, I. Debeaujon, L. Pourcel, M. Caboche, J. Einhorn and L. Lepiniec (2006). "Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*." *Planta* **224**, 96-107.
- Ryan**, K. G., E. E. Swinny, K. R. Markham and C. Winefield (2002). "Flavonoid gene expression in transgenic and mutant *Petunia* leaves." *Phytochemistry* **59**, 23-32.

- Saito**, K., M. Kobayashi, Z. Gong, Y. Tanaka and M. Yamazaki (1999). "Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*." *The Plant Journal* **17**, 181-189.
- Sato**, M., S. Q. Islam, S. Awata and T. Yamasaki (1999). "Flavanonol glucoside and proanthocyanidins: oviposition stimulants for the cerambycid beetle, *Monochamus alternatus*." *Journal of Pesticide Science* **24**, 123-129.
- Scalbert**, A. (1991). "Antimicrobial properties of tannins." *Phytochemistry* **30**, 3875-3883.
- Shoenbohm**, C., S. Martens, C. Eder, G. Forkmann and B. Weisshaar (2000). "Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme". *Biol. Chem.* **381**, 749-753.
- Schofield**, C. J. and Z. Zhang (1999). "Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes." *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 722-731.
- Seeram**, N. P., R. Lee, H. S. Schueller and D. Heber (2006). "Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy." *Food Chemistry* **97**, 1-11.
- Serafini**, M., R. Bugianesi, G. Maiani, S. Valtuena, S. De Santis and A. Crozier (2003). "Plasma antioxidants from chocolate" *Nature* **424**, 1013.
- Shen**, G., Y. Pang, W. Wu, X. Liu, L. Zhao, X. Sun and K. Tang (2006). "Isolation and characterization of putative anthocyanidin reductase gene from *Ginkgo biloba*." *Journal of Plant Physiology* **163**, 224-227.
- Shimada**, N., R. Sasaki, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, T. Aoki and S. Ayabe (2005). "A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome". *J. Exp. Bot.* **56**, 2573-2585.
- Singh**, S., J. McCallum, M. Y. Gruber, G. H. N. Towers, A. D. Muir, B. A. Bohm, M. R. Koupai-Abyazani and A. D. M. Glass (1997). "Biosynthesis of flavan-3-ols by leaf extracts of *Onobrychis viciifolia*." *Phytochemistry* **44**, 425-432.
- Snyder**, B. A. and R. L. Nicholson (1990). "Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress". *Science* **248**, 1637-1639.
- Solomon**, E. I., T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S-K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y-S. Yang and J. Zhou (2000). "Geometric and electronic structure/function correlations in non-hem iron enzymes." *Chem. Rev.* **100**, 235-349.

- Sparvoli**, F., C. Martin, A. Scienza, G. Gavazzi and C. Tonelli (1994). "Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.)." *Plant Mol. Biol.* **24**, 743-755.
- Spirbille**, R. and G. Forkmann (1984). "Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flower buds of *Matthiola incana*." *Z. Naturforsch.* **39c**, 714-719.
- Stafford**, H. A. and H. H. Lester (1984). "Flavan-3-ol biosynthesis: the conversion of (+)-dihydroquercetin and flavan-3,4-*cis*-diol (leucocyanidin) to (+)-catechin by reductases extracted from cell suspension cultures of Douglas Fir." *Plant Physiol.* **76**, 184-186.
- Stafford**, H. A. and H. H. Lester (1985). "Flavan-3-ol biosynthesis. The conversion of (+)-dihydromyrecetin to its flavan-3,4-diol (leucodelphinidin) and to (+)-gallocatechin by reductases extracted from tissue cultures of *Ginkgo biloba* and *Pseudotsuga menziesii*." *Plant Physiology* **78**, 791-794.
- Stafford**, H. A. (1988). "Proanthocyanidins and the lignin connection." *Phytochemistry* **27**, 1-6.
- Stafford**, H. A. (1990). "Pathway to proanthocyanidins (condensed tannins), flavan-3-ols and unsubstituted flavans." *Stafford H. A., ed. Flavonoid metabolism. Boca Raton, FL, USA: CRC Press*, 63-99.
- Stoutjesdijk**, P. A., P. W. Sale and P. J. Larkin (2001). "Possible involvement of condensed tannins in aluminium tolerance of *Lotus pedunculatus*." *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 1063-1074.
- Tanner**, G. J., K. T. Francki, S. Abrahams, J. M. Watson, A. R. Larkin and A. R. Ashton (2003). "Proanthocyanidin biosynthesis in plants." *J. Biol. Chem.* **278**, 31647-31656.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature* **408**, 796-815.
- Thompson** M. and C. R. Williams (1976). "Stability of flavonoid complexes of copper (II) and flavonoid antioxidant activity." *Anal. Chim. Acta* **85**, 375-381.
- Towbin**, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Turnbull**, J. J., J.-I. Nakajima, R. W. D. Welford, M. Yamazaki, K. Saito and C. J. Schofield (2004). "Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis." *Journal of Biological Chemistry* **279**, 1206-1216.

- Ueyama**, Y., K. Suzuki, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, K. Miyazaki, H. Ohkawa, T. Kusumi and Y. Tanaka (2002). "Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes". *Plant Science* **163**, 253-263.
- Uimari**, A. and J. Strömmer (1998). "Anthocyanin regulatory mutation in pea: effects on gene expression and complementation by R-like genes of maize". *Mol. Gen. Genet.* **257**, 198-204.
- Valegård**, K., A. C. von Scheltinga, M. D. Lloyd, T. Hara, S. Ramaswamy, A. Perrakis, A. Thompson, H.-I. Lee, J. E. Baldwin, C. J. Schofield, J. Hajdu and I. Andersson (1998). "Structure of cephalosporin synthase." *Nature* **394**, 805-809.
- Valegård**, K., A. C. von Scheltinga, A. Dubus, G. Ranghino, L. M. Öster, J. Hajdu and I. Andersson (2004). "The structural basis of cephalosporin formation in a mononuclear ferrous enzyme." *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 95-101.
- Vazquez-Flota**, F., E. D. Carolis, A.-M. Alarco and V. D. Luca (1997). "Molecular cloning and characterization of desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* L. G. Don." *Plant Molecular Biology* **34**, 935-948.
- Veit**, M. and G. F. Pauli (1999). "Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves." *J. Nat. Prod.* **62**, 1301-1303.
- Weiss**, D., A. H. van der Luit, J. T. M. Kroon, J. N. Mol and J. M. Kooter (1993). "The petunia homologue of *Antirrhinum majus* candi and *Zea mays* A2 flavonoid genes; homology to flavanone 3-hydroxylase and ethylene-forming enzyme." *Plant Mol. Biol.* **22**, 893-897.
- Weisshaar**, B. and G. I. Jenkins (1998). "Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation". *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 251-257.
- Welford**, R. W. D., J. J. Turnbull, T. D. W. Claridge, A. G. Prescott and C. J. Schofield (2001). "Evidence for oxidation at C-3 of the flavonoid C-ring during anthocyanin biosynthesis." *Chem. Commun.* 1828-1829.
- Wellmann**, F., M. Griesser, W. Schwab, S. Martens, W. Eisenreich, U. Matern and R. Lukačín (2006). "Anthocyanidin synthase from *Gebera hybrida* catalyzes the conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin". *FEBS Letters* **580**, 1642-1648.
- Wilmouth**, R. C., J. J. Turnbull, R. W. D. Welford, I. J. Clifton, A. G. Prescott and C. J. Schofield (2002). "Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*." *Structure* **10**, 93-103.

- Winefield**, C. S., D. H. Lewis, E. E. Swinny, H. B. Zhang, H. S. Arathoon, T. C. Fischer, H. Halbwirth, K. Stich, C. Grosch, G. Forkmann and K. M. Davies (2005). "Investigation of biosynthesis of 3-deoxyanthocyanins in *Sinningia cardinalis* ". *Phsiol. Plant* **124**, 419-430.
- Winkel-Shirley** B. (2001). "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology." *Plant Physiol.* **126**, 485-493.
- Xiao**, Y.-H., Z.-S. Zhang, M.-H. Yin, M. Luo, X.-B. Li, L. Hou and Y. Pei (2007). "Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fiber." *Biochem. And Biophys. Research Communication* **358**, 73-78.
- Xie**, D-Y., S. B. Sharma and R. A. Dixon (2004). "Anthocyanidin reductase from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **422**, 91-102.
- Xie**, D-Y., L. A. Jackson, J. D. Cooper, D. Ferreira and N. L. Paiva (2004). "Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol 4-reductas from *Medicago truncatula*". *Plant Physiol.* **134**, 979-994.
- Xie**, D-Y. and R. A. Dixon (2005). "Proanthocyanidin biosynthesis-still more questions than answers?." *Phytochemistry* **66**, 2127-2144.
- Xu**, B.-B., J.-N. Li, X.-K. Zhang, R. Wang, L.-L. Xie and Y.-R. Chai (2007). "Cloning and molecular characterization of a functional flavonoid 3'-hydroxylase gene from *Brassica napus*." *Journal of Plant Physiology* **164**, 350-363.
- Yan**, Y., J. Chemler, L. Huang, S. Martens and M. A. G. Koffas (2005). "Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*". *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3617-3623.
- Zhang**, Z. H., J. S. Ren, D. K. Satmmers, J. E. Baldwin, K. Harlos and C. J. Schofield (2000). "Structural origins of the selectivity of trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase." *Nat. Struct. Biol.* **7**, 127-133.

Lebenslauf

Geboren:	22.11.1979 in Neubrandenburg
Abitur:	1999, Fachgymnasium in Neubrandenburg
Biochemiestudium:	Oktober 1999 – September 2004, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
Vordiplom:	Sommer 2001 in Greifswald
Diplom:	Sommer 2003 in Greifswald
Diplomarbeit:	November 2003 – August 2004 in der Organischen Chemie in Greifswald
Praktische Ausbildung:	März 2002 Praktikum (1.Teil) in der Abteilung Forensische Toxikologie am Institut für Rechtsmedizin der Ernst-Moritz- Arndt Universität Greifswald August 2002 Praktikum (2.Teil) in der Abteilung Forensische Toxikologie am Institut für Rechtsmedizin der Ernst-Moritz- Arndt Universität Greifswald
Promotion:	Vom 01. März 2005 bis zum 31. August 2008 Promotion unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Matern am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg